

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

E INVESTIGACIÓN

**“EFECTOS DE LAS HORMONAS OVÁRICAS SOBRE LA
EXPRESIÓN DE LOS COMPLEJOS CDK5/P35-P25 Y
CDK2/CICLINA A EN EL CEREBRO BASAL ANTERIOR Y SOBRE
LAS CAPACIDADES COGNITIVAS DE LA RATA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

M. EN C. EN FARMACOLOGÍA

PRESENTA

NOEMÍ PLATA CRUZ

DIRECTORA DE LA TESIS: DR^A. JUDITH ESPINOSA RAY^A

MÉXICO, D.F; JUNIO 2011.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 12.38 horas del día 06 del mes de mayo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La ESM para examinar la tesis titulada:

"Efecto de las hormonas ováricas sobre los complejos Cdk5/p35-p25 y Cdk2/Ciclina A en el cerebro basal anterior y sobre las capacidades cognitivas de la rata".

Presentada por el alumno:

Plata	Cruz	Noemí						
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)						
		B	0	9	1	7	9	8

aspirante de:

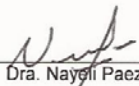
Maestría en Ciencias de Farmacología

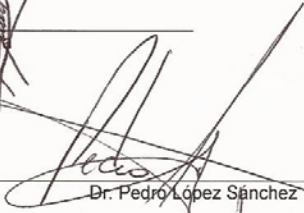
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis


Dra. Judith Espinosa Rayo


Dra. Nayeli Paez Martinez


Dr. Pedro Lopez Sanchez


Dr. Ofir Picazo Picazo


Dr. Christian Humberto Guerra Araiza

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Eleazar Lara Padilla





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F., el día 06 del mes mayo del año 2011, la que suscribe **Noemí Plata Cruz** alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Farmacología con número de registro **B091798**, adscrita a la **Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Judith Espinosa Raya** y cede los derechos del trabajo intitulado “**Efecto de las hormonas ováricas sobre los complejos Cdk5/p35-p25 y Cdk2/Ciclina A en el cerebro basal anterior y sobre las capacidades cognitivas de la rata**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección nplata@live.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Noemí Plata Cruz
registro **B091798**

“El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Farmacología Conductual de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación en la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Judith Espinosa Raya”

Este trabajo de investigación (TESIS) se expuso en el VII y VIII Congreso “Encuentro de la mujer en la ciencia” y en la “15ª reunión anual de la Sociedad de Neuroendocrinología Conductual (SBN)”

A mi familia, siempre unida y con toda su confianza depositada en mí.

A Yoan por todo su apoyo, comprensión y paciencia que me permitieron crecer y ser fuerte a su lado. Cada uno de ustedes ilumina mis días con el simple recuerdo de su presencia en mi vida...los amo.

AGRADECIMIENTOS

A mamá por preocuparse por mí y valorar todo lo que hago. A mis hermanos por su confianza y por animarme día tras día en todo lo que emprendo. Le doy gracias a Dios por dejarme crecer dentro de una familia tan grande y hermosa, porque la unión y el amor que nos tenemos es el mismo de siempre y se ha fortalecido mucho más con la distancia...los amo y extraño mucho.

A papá por enseñarme el valor de la responsabilidad: “cuando uno es responsable, no importa si llega con un calcetín impar al trabajo, la cuestión es llegar”. No puedo decir que me haces falta porque tu presencia me guía en cada paso y tus consejos son un fuerte roble en mi vida.

A mis amigos del laboratorio que compartieron conmigo años de intensas emociones, de esos años que cuando uno voltea a mirar atrás se transforman en días, en minutos, en instantes que dejan marcada la memoria y que perdurarán en mí porque ahora son parte de lo que soy: Delia, Bere, Uli, Gaby, Niche.

A Tere, para ti debería hacer otra tesis con la recopilación de los momentos que fueron fortaleciendo nuestra amistad, eso sería muy fácil y me reiría con cada palabra escrita pues eso es lo más grandioso que pude aprender de tí, a sonreírle a la vida. Gracias por tu confianza y compañía, por tus consejos, por tu guía y tu paciencia, (créeme que esta meta no la habría cumplido sin tu apoyo) pero sobretodo gracias por abrir tu corazón, por mostrarme el gran ser humano que eres y por dejar que tu niña interior jugara siempre conmigo.

A mi “amigui”, la Dra. Judith Espinosa Raya. No tengo palabras para agradecer todo lo que he aprendido de ti, comprendí que difícilmente habría comprendido la vida si Dios no hubiera puesto a un gran maestro en mi

camino. Gracias por todo tu apoyo y por creer en mí como profesionista y como amiga.

Al Dr. Ofir Picazo por permitir que me integrara a su selecto equipo de trabajo en el laboratorio, por su apoyo profesional y también por su amistad.

Al Dr. Christian Guerra Araiza por permitir que trabajara en su laboratorio, por regalarme un poco de su tiempo y conocimientos. Por saber escuchar y por sus sabios consejos.

Al COMITÉ TUTORIAL integrado por:

Dra. Judith Espinosa Raya.

Dra. Nayeli Paez Martínez.

Dr. Pedro López Sánchez.

Dr. Ofir Picazo Picazo.

Dr. Christian Guerra Araiza.

Por enriquecer esta tesis con su conocimiento y amplia experiencia.

A la SIP del IPN, COFAA y CONACyT.

INDICE.

RESÚMEN	17
ABSTRACT	18
INTRODUCCIÓN	19
MARCO TEÓRICO	20
MEMORIA Y APRENDIZAJE	20
DEFINICIÓN DE MEMORIA Y APRENDIZAJE	20
TIPOS DE APRENDIZAJE	21
CONDICIONAMIENTO OPERANTE O INSTRUMENTAL	23
CEREBRO BASAL ANTERIOR	26
CBA Y NEURODEGENERACIÓN	29
HORMONAS OVÁRICAS: SÍNTESIS Y MECANISMOS DE ACCIÓN	30
BIOSÍNTESIS DE ESTRÓGENOS	31
BIOSÍNTESIS DE PROGESTÁGENOS	33
MECANISMO DE ACCIÓN DE ESTRÓGENOS Y PROGESTÁGENOS	36
RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA	37
MECANISMOS DE NEUROPROTECCIÓN EJERCIDOS POR ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA.	42
MECANISMOS DE NEUROPROTECCIÓN EJERCIDOS POR ESTRÓGENOS.	43
MECANISMOS DE NEUROPROTECCIÓN EJERCIDOS POR PROGESTERONA.	49
MENOPAUSIA	51
MENOPAUSIA Y DETERIORO COGNITIVO.	53
CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS	55
TIPOS DE CDK'S	56
CICLINAS	57

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CDK'S	58
ORIENTACIÓN DE LAS CICLINAS HACIA SU SUSTRATO.	62
SUBUNIDADES INHIBIDORAS DE CDK'S	63
MECANISMO DE PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR.	65
ROL BIOLÓGICO DE OTRAS CDK'S	71
DESREGULACIÓN DE CDK5	76
REACTIVACIÓN DEL CICLO CELULAR EN NEURONAS MADURAS.	79
RELACIÓN DE LAS CDK'S Y CICLINAS CON LAS HORMONAS OVÁRICAS.	81
TAU: IMPLICACIONES EN LA NEURODEGENERACIÓN.	82
EL GEN HUMANO DE TAU	83
FOSFORILACIÓN DE TAU POR CDK5	85
EFFECTO DE LAS HORMONAS ESTEROIDES SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU.	89
JUSTIFICACIÓN	90
HIPÓTESIS	91
OBJETIVO GENERAL.	91
OBJETIVOS PARTICULARES	91
METODOLOGIA	92
ANIMALES Y GRUPOS DE TRATAMIENTO	92
PRUEBA DE AUTOAPRENDIZAJE	92
PRUEBA DE ACTIVIDAD ESPONTÁNEA.	94
OBTENCIÓN DE TEJIDO	94
INMUNO BLOT	95
RESULTADOS	96
DISCUSIÓN	99
CONCLUSIONES	117

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1. Modelo celular de las interacciones implicadas en la consolidación de la memoria y su reforzamiento.	25
Fig. 2. Sistema colinérgico central y sus proyecciones.	27
Fig. 3 Biosíntesis de estrógenos y progesterona	35
Fig. 4. Estructura química del 17β -Estradiol	36
Fig. 5. Estructura de la P_4 después de la oxidación final.	36
Fig.6. Dominios funcionales de los receptores de hormonas esteroides.	39
Fig.7. Dominios funcionales e isoformas de los receptores de progesterona.	41
Fig 8. Efectos Genómicos del RE	44
Fig 9. Efectos no genómicos de los estrógenos.	45
Fig. 10. Homodímero del RE en unión al ADN	46
Fig. 11. Complejo de iniciación de la transcripción	47
Fig.12. Estructura terciaria de Cdk2 humana.	60
Fig 13. Fases del ciclo celular.	66
Fig. 14. Papel propuesto de los complejos Cdk/Ciclina en el ciclo celular de mamíferos.	70
Fig. 15. Sustratos conocidos de Cdk5/p35 y Cdk5/p25	74
Fig 16. La desregulación de Cdk5 en la patogénesis.	78
Fig. 17. Proteína asociada a microtúbulos Tau.	88
Fig. 18. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal, a corto plazo, sobre la capacidad cognitiva de la rata.	98
Figura 19. Efecto de la ovariectomía y la terapia de reemplazo sobre la actividad espontánea total de la rata.	99
Figura 20. Efecto de la ovariectomía y la terapia de reemplazo sobre la actividad espontánea ambulatoria de la rata.	100

Figura 21. Efecto de la ovariectomía y la terapia de reemplazo sobre la actividad vertical de la rata.	100
Fig.22 Efecto de la ovariectomía y la terapia de reemplazo sobre el contenido de Cdk5.	101
Figura 23. Efecto de la ovariectomía y la terapia de reemplazo sobre el contenido de p35.	102
Figura 24. Efecto de la ovariectomía y la terapia de reemplazo sobre el contenido de p25.	103
Fig 25. Relación Cdk5/p35	104
Fig 26. Relación Cdk5/p25	105
Fig 27. Relación p35/p25	106
Figura 28. Efecto de la ovariectomía y la terapia de reemplazo sobre el contenido de Tau Total.	107
Figura 29. Efecto de la ovariectomía y la terapia de reemplazo sobre el contenido de PHF-1.	108
Fig 30. Relación PHF-1/Tau.	109
Figura 31. Efecto de la ovariectomía y la terapia de reemplazo sobre el contenido de Cdk2.	110
Figura 32. Efecto de la ovariectomía y la terapia de reemplazo sobre el contenido de Ciclina A.	111
Tabla 1. Anticuerpos utilizados en este estudio.	98

GLOSARIO

ACh	Acetilcolina
AChT	Acetilcolina Transferasa
AF-1	Función de activación 1
AF-2	Función de activación 2
Akt	V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog (Oncogenhomólogo a timoma murino viral)
AMPc	Adenosina 3' - 5' monofosfato cíclico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BD-SM	Complejo banda diagonal-septum medial
CAK	Cinasa activadora de cdk's
CBA	Cerebro Basal Anterior
ChAT	Colinoacetiltransferasa
Cdk's	Cinasas dependientes de ciclinas
Cdk5	Cinasa dependiente de cilina 5
Cdk2	Cinasa dependiente de ciclina 2
CKI	Inhibidor de Cdk's
DA	Dopamina
DBD	Dominio de unión a DNA
EA	Enfermedad de Alzheimer

EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos
ERH	Elementos de respuesta a hormonas
ERK regulada	Extracellular signal regulated kinase (Proteincinasa por señalización extracelular)
ERP	Elementos de respuesta a progesterona
E ₂	17-β Estradiol
FSH	Hormona estimulante del folículo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA _A	Receptor tipo A de Ácido gama-aminobutírico
GF	Growth Factor (Factor de crecimiento)
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GSK3β	Cinasa glicógeno sintasa 3β
HSP 90, 70	Heat shock protein (proteínas de choque térmico 90, 70)
JNK	Jun N-terminal cinasas
LBD	Dominio de unión a ligando
LH	Hormona Luteinizante
MAG	Myelin associated glycoprotein
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno

NA	Noradrenalina
NBM	Núcleo basal magnocelular
OVX	Ovariectomía
PI3K	Phosphatidil inositol triphosphato kinase
PKA	Proteincinasa A
Post-OVX	Postovariectomía
P ₄	Progesterona
p25	Proteína de 25KDa
p35	Proteína 35KDa
p53	Proteína p53
PHF	Phosphorylated Helical Filaments
RAC:	RAS-Related C3 Botulinum (Sustrato de la toxina Botulina C3 asociada a Ras)
RC	Respuesta condicionada
REs	Receptores de estrógenos
RE- α	Receptor estrogénico isoforma α
RE- β	Receptor estrogénico isoforma β
RE-X	Receptor estrogénico X
Rf	Reforzador
RI	Respuesta incondicionada

RN	Receptores nucleares
RoA	Ras homolog member A
RNA _m	Adenosina ribonucleótido fosfato tipo mensajero
RPA	Receptor de progesterona isoforma A
RPB	Receptor de progesterona isoforma B
RP _s	Receptores de progesterona
SERM's	Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos
SM	Septum medial
SMRT	Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors (mediador del silenciamiento por TR y RAR)
SNC	Sistema nervioso central
SOS	Son of sevenless
Src-1	Steroid receptor coactivador-1
STAT:	Transductor de señales y activador de la transcripción.
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR-1,2	Receptores del factor de necrosis tumoral 1 y 2
TRH	Terapia de reemplazo hormonal
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRAF	Factor asociado a TNF

VDB Banda diagonal del limbo vertical de Broca

WHINIH Iniciativa de salud de la mujer de los institutos
nacionales de salud

RESUMEN.

A pesar de que se conoce que los estrógenos pueden influenciar la memoria y el aprendizaje y protege contra enfermedades neurodegenerativas, su mecanismo exacto de acción aún no ha sido establecido. Estudios en mujeres postmenopáusicas y en animales establecieron que los estrógenos influyen aspectos de memoria, aprendizaje y estados de ánimo. Además parecen retrasar la declinación de las funciones cognitivas asociadas con enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Además se ha visto que muchos estrógenos atenúan el efecto del daño por infarto o traumatismo cerebral.

Se sabe que tanto la cinasa dependiente de ciclina 5/proteína 35–proteína 25 (Cdk5/p35-p25) como la cinasa dependiente de ciclina 2/ciclina A (Cdk2/Ciclina A) intervienen en la fosforilación de la proteína TAU y que solo este último complejo aumenta la actividad de los receptores a progesterona. Además, la hiperfosforilación de la primera está íntimamente relacionada con el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer.

En este estudio, proponemos que la interacción de las proteínas Cdk5/p35-p25 y Cdk2/Ciclina A con las hormonas ováricas estradiol y progesterona explican la neuroprotección reportada para estas hormonas en regiones colinérgicas.

Por lo anterior, analizamos el contenido de las proteínas de interés mediante inmunoblot, en el cerebro basal anterior de ratas ovariectomizadas tratadas hormonalmente. Los resultados de este experimento fueron relacionados con la capacidad cognitiva de las ratas.

Nuestros resultados sugieren una mejoría de la memoria en ratas tratadas con altas dosis de estradiol y progesterona (40 ug/kg y 4 mg/kg respectivamente). Además se observó que las proteínas de los complejos se modificaron en relación con la dosis ensayada de ambas hormonas.

ABSTRACT

Several studies have suggested that estrogen replacement therapy in postmenopausal women improves cognition and delay the onset of dementia associates with neurodegenerative diseases, as Alzheimer Disease (AD) or Parkinson. In addition, estrogens attenuate the effect of the injury for heart attack or cerebral traumatism, and exert influence on the mood. However, the mechanism whereby estrogens exert this neuroprotective effect is now unclear.

In this study, we propose two systems of cyclins (cyclin dependent kinase 5/protein 35-25 and cyclin dependent kinase 2/cyclin A) whose participation out of the cellular cycle and in association with the ovarian hormones can be involved in the mechanism of estrogen neuroprotection. This hypothesis comes from previous studies where have shown that such complexes participate in the activity of progesterone receptors and phosphorylation of Tau protein, this latter protein has an important role on the development of AD.

We used ovariectomized rats which were divided into treatment groups with different doses of 17β estradiol or progesterone, these treatments were administered during 2 weeks and then we analyze the cognitive abilities of the rats through autoshaping test. Finally, we analyzed the content of proteins of interest in the basal forebrain by western blot assay.

Our results suggest that improve of memory of ovariectomized rats is dose hormone dependent and it is related with changes in the complex of proteins studied.

INTRODUCCIÓN.

Existe evidencia creciente de que la pérdida de la producción de estrógenos después de la menopausia contribuye a la declinación cognitiva (Simpkins, 1997; Villarroya-Pastor, 2001; Wu, 2008) y tiene un fuerte impacto sobre la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Liqin Zhao, 2006; Byung et al, 2008) y otras formas de demencia (Vegeto et al, 2008). Además, datos estadísticos indican que diversas alteraciones neurodegenerativas ocurren más a menudo en mujeres que presentan hipoestrogenismo prolongado (Henderson et al, 2000b; Simpkins, 1997; Gibbs, 1998; Henderson, 2008).

Estudios recientes sugieren que el reemplazo de estrógenos en mujeres puede ayudar a prevenir el desarrollo de la EA y reducir la severidad de la demencia asociada a ésta (Gibbs, 1996; Prokaia, 2007; Wu, 2008; Ryan et al, 2008). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual tienen este efecto aún no es claro (Prokaia, 2007). Algunos de los mecanismos pueden ser debidos, en parte, a la habilidad de los estrógenos como el 17β -estradiol (E_2) (Dumas et al, 2008) para incrementar la función de las neuronas colinérgicas (Villarroya, 2001) localizadas en regiones específicas del cerebro basal anterior (CBA) (Gibbs, 1996, 1998; Bohacek, 2008; Dumas et al, 2008; Karyn M. y Frick, 2009). Para esto, se ha sugerido que los estrógenos pueden influenciar directamente las neuronas colinérgicas vía unión intracelular a sus receptores seguido por efectos mediados por los esteroides sobre la transcripción genética, aunque la posibilidad de que los estrógenos pueden actuar en las neuronas colinérgicas indirectamente también puede ser considerada, (Gibbs, 1998; Dawrban, 2003). Por ejemplo, se ha descrito uno de estos mecanismos indirectos donde las hormonas esteroides median diversos efectos sobre la proliferación celular en asociación con la actividad moduladora de las ciclinas, de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK's) y los inhibidores de éstas (Pestel et al, 1999). En diferentes estudios se ha

encontrado que los estrógenos activan la proliferación en células epiteliales y líneas celulares de cáncer de mama, asociando a ambos esteroides con la activación de complejos Ciclina/Cdk/inhibidor de la CDK (CDKI) (Pestel et al, 1999).

MARCO TEÓRICO.

MEMORIA Y APRENDIZAJE.

El aprendizaje y la memoria son mecanismos importantes de adaptación a las complejas y cambiantes condiciones ambientales. Como consecuencia de los procesos de aprendizaje y memoria, los animales modifican su conducta al exponerse a estímulos relevantes a los que ya se han enfrentado con anterioridad (Almaguer et al 2002).

DEFINICIÓN DE MEMORIA Y APRENDIZAJE

Desde el punto de vista procedimental, no se consigue separar el aprendizaje de la memoria, ni resulta posible realizar dicha distinción dentro del circuito neuronal. La medida de lo aprendido se relacionaría con la memoria, siendo ésta la expresión de la capacidad de recuperar informaciones adquiridas. Por tanto, los dos procesos tienen una relación íntima.

En el “lenguaje” del sistema nervioso central (SNC), aprender significa producir una referencia básica a través de los patrones neuronales construidos e incorporados a lo largo de las diversas etapas comprendidas entre el nacimiento y la madurez. La memoria sería la capacidad del individuo de retener y utilizar formaciones de diferentes maneras y en diferentes períodos (Machado et al, 2008).

TIPOS DE APRENDIZAJE

Como la memoria, el aprendizaje no es un proceso único, sino que tiene dos formas principales. Una forma, considerada explícita, se relaciona con los procesos cognitivos; la otra, considerada implícita, con los procesos motores o el aprendizaje verbal, sin ser dependiente de los procesos cognitivos.

Las formas implícitas de aprendizaje pueden ser no asociativas o asociativas. En la primera, la respuesta a un estímulo se produce en función del tiempo y se observa a través del comportamiento. Existen dos tipos de aprendizaje no asociativo: habituación y sensibilización.

La habituación se entiende como la reducción de la eficiencia al estímulo que, por no ser significativo, conduce a ignorarlo. Se supone que tal fenómeno es el resultado de la disminución de la cantidad de glutamato liberado por la terminación presináptica y de la reducción de la capacidad de las vesículas. Este hecho produce el almacenamiento de una memoria reflexiva simple, que no se restringe a un solo lugar, pero que se distribuye a lo largo del circuito neuronal y probablemente representa el proceso de memoria a corto plazo para la habituación.

La sensibilización es la intensificación de la respuesta en función de un fuerte estímulo capaz de producir incluso la percepción de estímulos que, anteriormente al hecho, se consideraban débiles.

Siendo considerada más compleja que la habituación en el proceso de aprendizaje no asociativo, la sensibilización puede durar minutos, días o incluso semanas. Mientras que la habituación provoca una reducción de la fuerza sináptica, la sensibilización origina una facilitación de ésta.

El aprendizaje asociativo, se denomina como la forma en que los seres vivos adquieren conocimiento acerca de la causalidad de un evento, es decir, la relación entre estímulos y respuestas (Correa, 2007). En términos simples, dentro de este contexto se encuentran tres variantes experimentales: condicionamiento clásico, condicionamiento instrumental (operante) y transferencia pavloviana-instrumental (Correa 2007).

En el primero, se produce la relación estímulo-respuesta, donde el primer estímulo evoca una respuesta que se puede medir de forma diferente a aquella que se produce como resultado de la aplicación del segundo estímulo. El primer estímulo es el estímulo incondicionado, que no requiere entrenamiento o preparación anticipada a la respuesta; el segundo es la estimulación condicionada, que necesita del entrenamiento específico sobre la acción motora pretendida. Este aprendizaje no presenta un intervalo de tiempo entre el estímulo condicionado y el incondicionado, el factor fundamental para que se produzca una convergencia de los estímulos sobre las neuronas sensoriales individuales. El condicionamiento operante es la asociación de un comportamiento particular a un estímulo significativo, una relación estímulo-comportamiento orgánico donde el acto motor es consecuencia de una respuesta neurofisiológica a un suceso (Correa, 2007; Machado, 2008). Éste último es el fundamento de nuestra prueba conductual, por lo tanto lo describiremos a continuación.

CONDICIONAMIENTO OPERANTE O INSTRUMENTAL.

Se describe por “la ley del efecto” (Correa, 2007) es la asociación de un comportamiento particular a un estímulo significativo, una relación estímulo-comportamiento orgánico donde el acto motor es consecuencia de una respuesta neurofisiológica a un suceso (Machado, 2008). La concepción de aprendizaje instrumental de Skinner también implica un reforzamiento pero en este caso, de las relaciones entre la respuesta y sus consecuencias. Skinner definió un reforzador (Rf) como una consecuencia (estímulo o actividad), que al seguir a la conducta instrumental, aumenta la probabilidad de que dicha conducta se repita en el futuro y, por tanto, el refuerzo aumentará la probabilidad de ocurrencia de cualquier respuesta instrumental que se dé justo antes de que aparezca el reforzador. Así pues, el condicionamiento instrumental es una forma de aprendizaje asociativo entre la realización de una conducta o R que, operando con el ambiente, sirve como el instrumento para la obtención de un Rf. Un Rf es un estímulo o actividad que incrementa la probabilidad de que se dé la R asociada a él, éste puede ser aversivo (Rf negativo) o apetitivo (Rf positivo). Se trata de un condicionamiento flexible (a diferencia del clásico pavloviano) en el cual el individuo actúa en función de las consecuencias de su conducta. La adquisición de una conducta instrumental dirigida a una meta (que es el Rf) implica dos formas de aprendizaje: el primero, aprender sobre la relación instrumental entre R-Rf y el segundo, aprender el valor del incentivo del propio Rf. (Correa, 2007).

Las diferencias más claras entre el condicionamiento clásico y el instrumental radican en que la RI, que más tarde se condiciona, en el clásico es una respuesta automática (refleja), mientras que en el condicionamiento instrumental el organismo emite una respuesta voluntaria para conseguir un Rf (Correa, 2007).

El sustrato neural que se ha estudiado en relación con el proceso de refuerzo se ha centrado en las estructuras que comprenden el haz proscencefálico medial, un grupo de axones que partiendo del mesencéfalo, proyectan a lo largo del eje rostro- caudal hasta el prosencéfalo basal rostral. Estas neuronas dan lugar a los sistemas dopaminérgicos mesolímbicos (Área Tegmental Ventral-núcleo acumbens/amígdala/hipocampo, entre otros), mesocortical (Área Tegmental ventral-neocórtexa prefrontal/corteza cingulada/hipocampo) y nigroestriatal (sustancia negra compacta-neoestriado). Se ha sugerido que la transmisión dopaminérgica en la corteza prefrontal-medial y en el núcleo acumbens es crucial para la adquisición de conductas instrumentales ya que la presentación de reforzadores primarios elevan los niveles de DA en ambas regiones (Correa, 2007).

En los años setenta, Matthies propuso un sugestivo modelo celular para explicar cómo podía ocurrir el proceso de consolidación de la memoria. Para Matthies, el estímulo condicionado produce cambios de transición en las sinapsis activadas, aunque éstas resultan demasiado débiles como para provocar una respuesta. Si dentro de una ventana temporal se produce la activación de sinapsis fuertes sobre las mismas neuronas, capaces de producir una respuesta (estímulo incondicionado), se produce simultáneamente la activación de la síntesis de nuevas proteínas, que pueden llegar hasta las sinapsis débiles antes activadas e incorporarse a ellas, y modificar su eficacia. La repetición de este apareamiento temporal entre estímulo condicionado y estímulo incondicionado conduce al desarrollo de un reflejo condicionado (**Fig. 1**) (Almaguer et al, 2002)

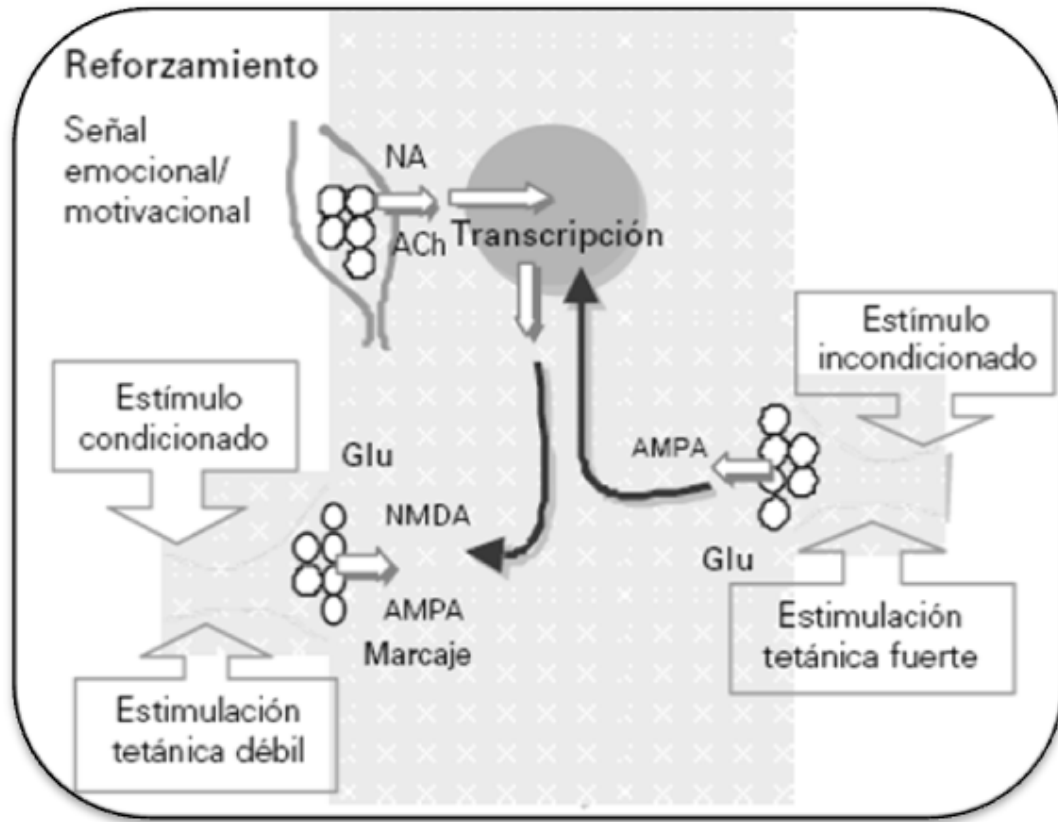


Figura 1. Modelo celular de las interacciones implicadas en la consolidación de la memoria y el reforzamiento. El esquema muestra una neurona asociativa en el hipocampo y algunas de sus aferencias. En los procesos de memoria, la activación de sinapsis excitadoras débiles (estímulo condicionado) puede conducir al incremento de su eficacia de transmisión, si se asocia temporalmente con la estimulación de otras sinapsis excitadoras fuertes (estímulo condicionado). El cambio duradero de eficacia sináptica dependerá de la activación de procesos de síntesis de proteínas que, al insertarse en las regiones postsinápticas marcadas (marcaje), conducen a su reforzamiento. Esas proteínas pueden incluir receptores glutamatérgicos de tipo AMPA. Tanto los procesos de consolidación de la memoria como el reforzamiento se benefician de la coactivación de sinapsis moduladoras activadas por el estado emocional y motivacional del individuo. Los neurotransmisores liberados por estas aferencias son potentes inductores de

la síntesis de proteínas. Estos procesos de reforzamiento emocional y motivacional se deterioran con el envejecimiento, probablemente por pérdida de las aferencias colinérgicas y adrenérgicas moduladoras. NA: noradrenalina; ACh: acetilcolina; Glu: glutamato; AMPA: receptores al glutamato que abren canales de sodio y participan en la transmisión sináptica; NMDA: receptores al glutamato que abren canales de calcio y participan en la inducción inicial del reforzamiento. Modificado de Almaguer, 2002.

CEREBRO BASAL ANTERIOR

El aprendizaje y la memoria son esenciales para los cambios en la conducta producidos en las pruebas de reforzamiento. La ACh está involucrada en la memoria explícita e implícita, utilizando distintos sistemas neuronales (Williams y Adinoff, 2008; Miasnicov, 2008).

Las neuronas colinérgicas del SNC surgen de múltiples recursos discretos proyectando a regiones cerebrales específicas con funciones bien definidas. Dentro del SNC la ACh está involucrada en conductas motrices, modulación del estado conductual asociado con información entrante tal como emocional, motivación y excitación así como procesos cognitivos complejos como atención, aprendizaje y memoria. Las regiones límbicas y paralímbicas del SNC contienen la más alta densidad de inervación colinérgica en el cerebro. Estas regiones incluyen el estriado ventral y dorsal, área ventral tegmental (VTA), sustancia nigra, amígdala, hipocampo y corteza prefrontal (Williams y Adinoff, 2008).

Las interneuronas colinérgicas son el principal fuente de ACh hacia el estriado dorsal y ventral. Estas interneuronas integran una variedad de información motora, límbica y cognitiva y la somete a plasticidad y

aprendizaje, el cual, a su vez, influencia la señalización de salida estriatal (Miasnicov et al, 2008).

En adición a las interneuronas estriatales, otra vía neuronal colinérgica de importancia para nuestro estudio es aquella que involucra a las estructuras del CBA, cuyas proyecciones colinérgicas están organizadas en grupos que inician rostralmente en el núcleo septal medial (MS), extendidas caudal y lateralmente a través de la Banda Diagonal de Broca (BDB), el núcleo preóptico magnocelular, la sustancia inominada (SI) y termina caudalmente dentro del núcleo pálido ventral donde los grupos de neuronas colinérgicas largas son referidas como el núcleo basal magnocelular (NBM) (Warnock, 2006; Gibbs, 2010). Las neuronas del NBM provee la entrada principal de ACh a la corteza cerebral y la amígdala y por otra parte la BDB y MS, provee la entrada primaria de ACh al hipocampo (**Fig. 2**), (Warnock, 2006; Miasnicov et al., 2008; Gibbs, 2010).

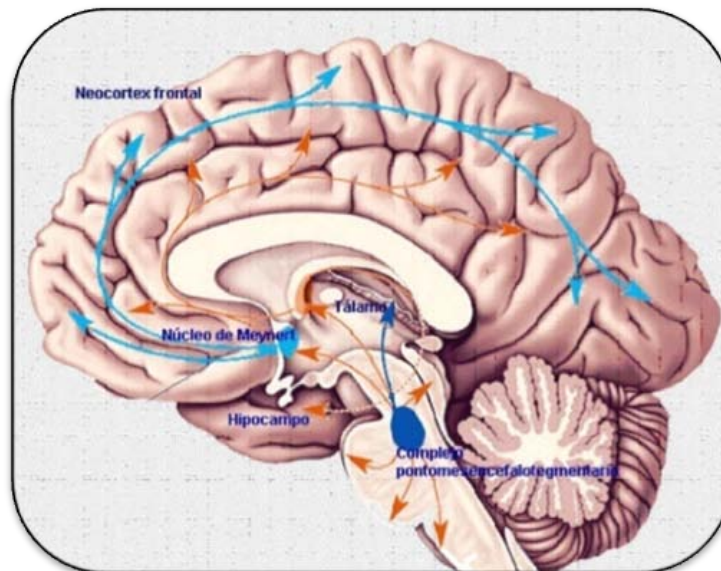


Fig. 2. Sistema colinérgico central y sus proyecciones.

El sistema colinérgico ha sido visto como una red neuronal general que comprende áreas colinérgicas del cerebro anterior (el complejo de la banda diagonal del septo medial y el núcleo basal magnocelular), las interneuronas del estriado y las células colinérgicas de áreas pontomesencefálicas.

Se ha documentado que las proyecciones colinérgicas al hipocampo y corteza cerebral tienen un papel importante en el proceso de atención, aprendizaje y memoria y existe fuerte evidencia de que el daño de la función colinérgica del CBA contribuye a la declinación cognitiva relacionada con la edad y a los síntomas fisiológicos y conductuales de la demencia (Gibbs, 2010).

Numerosos datos provenientes de diferentes enfoques experimentales sugieren que el sistema colinérgico septohipocampal es suficiente para la función normal de la memoria. Estos hallazgos incluyen: la evidencia de la activación del sistema colinérgico durante el aprendizaje y memoria en animales intactos, una correlación entre los efectos de la manipulación de la memoria y la actividad de la ACh hipocampal y la reversión del déficit de la memoria mediante el incremento de la función colinérgica (Parent y Baxter, 2004).

Tales hallazgos sugieren que la ACh es liberada durante muchos tipos de aprendizaje y que su efecto a través del cerebro puede promover la formación de la memoria y/o incrementar su reforzamiento (Miasnikov et al, 2008).

El interés neurocientífico suscitado por el CBA ha sido motivado por el hecho de que una de las principales características de la EA es la degeneración de neuronas colinérgicas del NBM (Montero-Pastor, 2004; Gibbs, 2010) y del SM (Gibbs, 2010). Hasta la fecha, el rango completo de déficit cognitivo

asociado con el deterioro colinérgico no está completamente claro (Gibbs, 2010).

CBA Y NEURODEGENERACIÓN

La importancia de las subregiones del CBA queda evidenciada con el síndrome amnésico, el cual puede definirse como la pérdida o ausencia de memoria como consecuencia de una alteración orgánica cerebral o psicógena, en las que son críticas la región temporal medial, el diencéfalo o la conexión entre las dos regiones, al igual que el área retrosplenial y el CBA (Llorente-Vizcaíno, 2001). La contribución del NBM en la modulación del estado de activación neural general se realiza fundamentalmente a través de sus proyecciones colinérgicas directas a prácticamente la totalidad de la corteza cerebral (Berntson et al., 2002)

Diferentes estudios han demostrado que los agentes que destruyen las neuronas colinérgicas del CBA, tales como neurotoxinas excitatorias, AF64A o la inmunotoxina selectiva saporina 192IgG o manipulaciones que bloquean sus proyecciones tales como inhibidores muscarínicos y lesiones mecánicas, producen déficit en la memoria y el aprendizaje similar a muchos tipos de déficit observados en la edad avanzada y EA (Gibbs, 1998). Sin embargo, los mecanismos responsables de la disminución de la función colinérgica con la edad y con la enfermedad no están bien establecidos. Algunos de los factores más importantes que se han relacionado con la supervivencia y función de las neuronas del CBA son los estrógenos como E_2 y las neurotrofinas (Gibbs, 1996; Singh, 1994; Smith, et al., 2005; Volosin, et al., 2006).

Infusiones septales de fármacos que incrementan la memoria, tales como el neuroesteroide sulfato de pregnenolona, incrementa la ACh hipocámpal. Una vía similar se observa con infusiones de fármacos dentro del hipocampo. Por

ejemplo, infusiones de glucosa dentro del hipocampo incrementa los niveles de ACh extracelulares e incrementa la memoria (Parent y Baxter, 2004)

HORMONAS OVÁRICAS: SÍNTESIS Y MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN.

Los estrógenos y progestágenos son hormonas endógenas que generan muchos efectos fisiológicos. En mujeres, éstos comprenden acciones vinculadas con el desarrollo, efectos neuroendócrinos que comprenden el control de la ovulación, la preparación cíclica de las vías de reproducción para la fecundación e implantación y los principales efectos sobre el metabolismo de los minerales, proteínas, carbohidratos y lípidos (Loose y Stancel, 2003).

En todas las especies de mamíferos, las gónadas y las glándulas adrenales sintetizan y liberan estrógenos dentro de la circulación general en ambos sexos. Esto contribuye a niveles circulantes relativamente bajos, excepto en hembras en la fase que dura desde la pubertad hasta el inicio de la senescencia reproductiva durante la cual los ovarios sintetizan y liberan cantidades mucho más grandes de estrógenos de una manera cíclica que mantiene la ovulación y la capacidad reproductiva (Gillies y McArthur, 2010). En hembras no embarazadas el estrógeno circulante principal y más potente es el 17β -estradiol (E_2); estrona y estriol están presentes en concentraciones más bajas (Heldring, et al., 2007; McCarthy, 2008; Gillies y McArthur, 2010). En varones y posmenopáusicas, la principal fuente de estrógenos es el estroma del tejido adiposo, donde se sintetiza estrona a partir de dehidroepiandrosterona secretada por la corteza suprarrenal (Loose y Stancel, 2003).

Las gónadas y las glándulas adrenales también sintetizan y secretan andrógenos en ambos sexos pero el máximo nivel de testosterona circulante

producida por los testículos maduros genera y mantiene el fenotipo sexual en machos, así como los estrógenos lo hacen en las hembras. Sin embargo, existe evidencia que señala la importancia de los estrógenos como los factores activos en la mediación de muchos de los efectos de la testosterona sobre tejidos blanco en machos donde las enzimas aromatasas son responsables de la síntesis local de estrógenos a partir de andrógenos circulantes. Además, la testosterona circulante actúa como un precursor de estrógenos, los cuales después actúan de manera paracrina en un gran número de tejidos que expresan aromatasas en la periferia y el cerebro (Gillies y McArthur, 2010). Sin embargo, actualmente se sabe que en adición a la aromatasas, el cerebro posee el complemento completo de enzimas requeridas para la síntesis de novo de esteroides a partir del colesterol y no solo de precursores adrenales o gonadales presentes en la circulación (Gillies y McArthur, 2010).

Las hormonas gonadales, cuando se sintetizan, presentan aspectos comunes que posteriormente se diversifican según el tejido y los mecanismos en que se llevan a cabo para producir los tres tipos de esteroides: andrógenos, estrógenos o gestágenos. El precursor de todos ellos es el colesterol, el cual es formado intracelularmente a partir de radicales acetato o es incorporado por las células y utilizado en las mitocondrias.

BIOSÍNTESIS DE ESTRÓGENOS.

En las células de la granulosa del ovario, durante la fase folicular, la pregnenolona formada a partir del colesterol sigue también la vía $\Delta 5$ para formarse 17α -hidroxipregnenolona, deshidroepiandrosterona, androstenediona y testosterona, la cual sufre el proceso de aromatización del anillo A del esteroide con pérdida de C19 para convertirse en el estrógeno E_2

(Fig 3). En el primer paso de esta reacción, el C19 sufre hidroxilación. Una segunda hidroxilación origina eliminación del grupo C19 hidroximetil recién formado y una hidroxilación final de C2 da por resultado la formación de un intermediario inestable que se reordena para formar el anillo fenólico A, este anillo es la principal característica estructural de la cual depende la unión selectiva de alta afinidad a los receptores estrogénicos, sobretodo, al subtipo α (McEwen y Alves, 1999; Toran-Allerand, 2005) **(Fig. 4)**. La reacción es catalizada en tres pasos por un complejo de enzima monooxigenasa P450 (aromatasa) que utiliza una flavoproteína omnipresente, la NADPH-citocromo P450 reductasa y oxígeno molecular como cosustratos, ambos se encuentran en el retículo endoplásmico de las células de la granulosa ovárica, células de Sertoli y de Leydig, células del estroma del tejido adiposo, sincitiotrofoblasto placentarios, blastocisto previo a la implantación y diversas regiones del cerebro; en el ovario, una pequeña parte de E_2 se convierte en estrona, pero en hígado, piel, tejido graso, músculo, endometrio e hipotálamo, la conversión en estrona es muy abundante.

En la fase folicular, la hormona folículo estimulante (FSH) es el estímulo de la secreción de E_2 tras la interacción con sus receptores de la granulosa. En la fase lútea persiste la secreción de E_2 partir de la producción de androstenediona y testosterona en las células tecales estimuladas por la hormona luteinizante (LH); los andrógenos difunden a las células de la granulosa, donde sufren la aromatización correspondiente.

Las mujeres premenopáusicas producen E_2 de forma variable a lo largo del ciclo: de 100 a 600 mg/día, lo que origina unos niveles plasmáticos que oscilan desde un mínimo de 50 pg/ml a un máximo preovulatorio de 250-300 ng/ml.

También se segregan estrógenos en el testículo, en pequeñas cantidades por aromatización de una pequeña fracción de testosterona, y en la placenta. La síntesis en la placenta es abundante, a partir principalmente del sulfato de deshidroisoandrosterona que se forma en la bien desarrollada corteza suprarrenal del feto.

La actividad de aromatasa es inducida por gonadotrofinas que actúan por medio de receptores de membrana para incrementar las concentraciones intracelulares de Adenosina 3'-5' monofosfato cíclico (AMPc). Las gonadotrofinas y el AMPc también incrementan la actividad de la enzima de desintegración de la cadena lateral del colesterol y facilitan el transporte de éste hacia las mitocondrias de células que sintetizan esteroides. El estradiol secretado se oxida de manera reversible hasta generar estrona mediante la 17- hidroxisteroide deshidrogenasa y esos dos esteroides pueden convertirse en estriol. Esas transformaciones ocurren principalmente en el hígado. Los tres estrógenos se excretan en la orina junto con glucurónidos y conjugados fosfato.

Los efectos estrogénicos se atribuyen más a menudo a hormonas circulantes, pero los estrógenos también pueden producirse localmente bajo ciertas circunstancias, por ejemplo, pueden producirse a partir de andrógenos por medio de la aromatasa que se encuentra en el SNC y ejercer efectos locales cerca del sitio de producción.

BIOSÍNTESIS DE PROGESTÁGENOS

Los progestágenos incluyen a la hormona natural progesterona (P_4) y diversos compuestos sintéticos que tienen actividad progestacional. Estos fármacos sintéticos se utilizan más a menudo con estrógenos en la

hormonoterapia de restitución en posmenopáusicas y solos o combinados con estrógenos para anticoncepción (Loose y Stancel, 2003).

La P_4 es secretada durante la segunda mitad del ciclo menstrual aunque también se observa su producción a partir de precursores en testículos, placenta y la corteza suprarrenal (Singh, 2005). La secreción empieza justo antes de la ovulación, a partir del folículo que está destinado a liberar un óvulo. El efecto estimulante de la hormona luteinizante sobre la síntesis y secreción de P_4 , por el cuerpo amarillo está mediado por un receptor unido a membrana enlazado a una vía de transducción de señales acoplada a proteína G que incrementa la síntesis de AMPc mediante estimulación de la adenililciclase.

Para ello, la pregnenolona sigue la vía $\Delta 4$, por lo que se convierte en progesterona y 17α -hidroxiprogesterona, bajo la acción estimulante de la LH. Durante las primeras semanas del embarazo, la P_4 se forma principalmente en el cuerpo lúteo, bajo la acción estimulante de la hCG, pero después lo hace en la placenta cuyas células trofoblásticas captan con enorme avidez las lipoproteínas LDL, las internalizan, hidrolizan los lípidos y utilizan el colesterol resultante para convertirlo en pregnenolona y P_4 (**Fig 3**).

Ésta se forma también en la corteza suprarrenal. La producción de P_4 es de 2-3 mg/día antes de la ovulación y de 20-30 mg/día durante la fase lútea. Los niveles sanguíneos de progesterona son de 1 ng/ml en mujeres impúberes, mujeres en fase folicular y en varones, y ascienden a 5-20 ng/ml en la fase lútea; en el momento del parto llegan hasta 100-200 ng/ml.

El paso limitante de la velocidad de la producción de hormonas esteroideas es la conversión de colesterol en pregnenolona, reacción catalizada por la enzima de desdoblamiento de cadena lateral de colesterol designada

P450sec, la cual permite la formación del precursor inmediato pregnenolona, el cual sufre una oxidación por medio de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa para concluir con la estructura de la P₄ cuya estructura de anillos aromáticos A, B, C, D se conserva desde el precursor (**Fig. 5**).

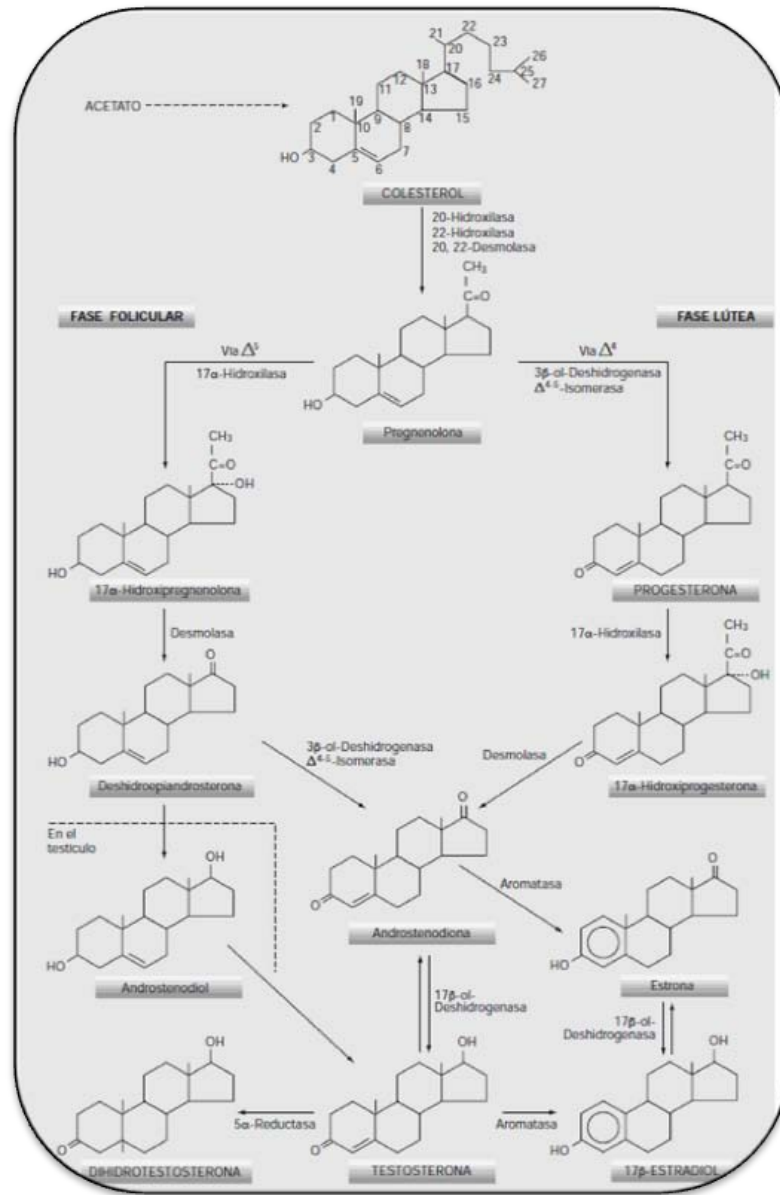


Fig. 3 Biosíntesis de estrógenos y progesterona. Ver texto para descripción.

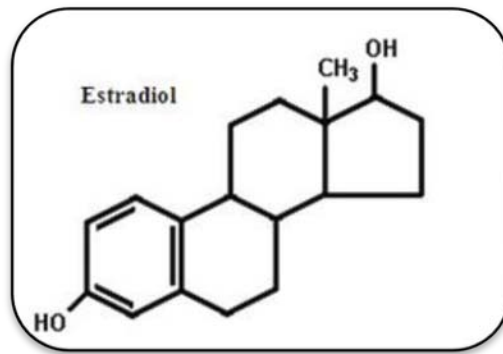


Fig. 4. Estructura química del 17β -Estradiol: molécula esteroidea de 18 carbonos que presentan un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3 (anillo A) además de un grupo b-hidroxilo en el carbono 17 (anillo D).

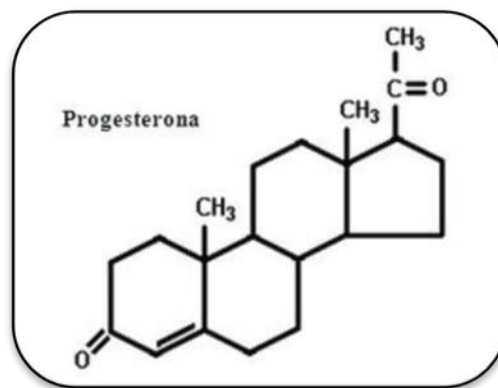


Fig. 5. Estructura de la P₄ después de la oxidación final. Se observan sus anillos A, B, C, D, al igual que el estradiol, el anillo A es importante para su unión selectiva a su receptor.

MECANISMOS DE ACCIÓN DE ESTRÓGENOS Y PROGESTÁGENOS.

Se ha considerado tradicionalmente que los receptores de hormonas esteroides actúan mediante la regulación de procesos transcripcionales, involucrando la translocación nuclear y la unión a elementos de respuesta específicos y finalmente, conduciendo a la expresión de genes. Sin embargo,

se han identificado nuevos mecanismos no transcripcionales de transducción de señales a través de los receptores de hormonas esteroides. Éstos, también llamados efectos “efectos no genómicos” no dependen de la transcripción de genes o de la síntesis de proteínas e involucran la modulación inducida por esteroides de proteínas reguladoras unidas a la membrana celular (Simoncini y Genazzani, 2003).

RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA.

Los estrógenos ejercen muchas de sus acciones biológicas por interacción con receptores celulares (Díaz, 2001; Heldring, 2007; McCarthy, 2008). Muchos estudios se han encargado del estudio de tales receptores de tal forma que actualmente se distinguen receptores de membrana, citoplásmicos y nucleares (Díaz, 2001); éstos últimos, son miembros de la superfamilia de factores de transcripción nuclear que regulan la expresión génica (Dubal, 2001; McCarthy, 2008). Se caracterizan por la presencia de un dominio central de unión a DNA que fija el receptor a secuencias de nucleótido específicas denominadas elementos de respuesta a hormonas (ERH), presentes en genes precondicionados (McCarthy, 2008).

Básicamente, se han caracterizado dos tipos principales de receptores: receptor estrogénico α (RE- α) y receptor estrogénico beta (RE- β) (Heldring, et al., 2007; Brinton, 2001). El primero es necesario para la regulación de la fisiología reproductiva dependiente de estrógenos, incluyendo muchos de sus componentes conductuales y también es el que se ha relacionado más con la actividad neuroprotectora del E₂ (Dubal, 2001). Ambos tipos de receptores tienen marcadas diferencias en cuanto a su distribución; mientras que el RE- α se encuentra en hipófisis, hipocampo, vagina, útero, mama, riñón y epidídimo; el RE- β se expresa en próstata, ovario y, en menor medida, encéfalo (McEwen, 2002). Actualmente se han identificado varias

isoformas de ER- β (McEwen y Alves 1999; Heldring, et al., 2007). Cabe señalar que se ha descrito un nuevo RE, denominado RE-X cuya función no se ha estudiado y aún no se ha determinado si pertenece a una isoforma de RE- α o RE- β , aunque se sabe, que al igual que estos últimos puede estimular vías de señalización intracelular (Díaz, 2001).

RE- α y RE- β son productos de genes separados localizados en diferentes cromosomas: 6 y 14, respectivamente (Díaz, 2001; McEwen, 2002). Como muchos otros miembros de la familia de receptores nucleares (RN), los REs contienen distintos dominios conservados estructural y funcionalmente a lo largo de la evolución (McEwen, 2002) (**Fig.6**), los cuales se han denominado con letras mayúsculas de la A a la F (Prieto et al., 2003). El dominio central y más conservado es el dominio de unión a DNA (DBD, por sus siglas en inglés), mientras que la unión al ligando ocurre en el dominio de unión a ligando COOH-terminal multifuncional (LBD, por sus siglas en inglés). El dominio terminal NH₂ (A/B) no se conserva y representa el dominio más variable en secuencia y longitud (McEwen, 2002; Prieto, 2003). La activación transcripcional es facilitada por dos funciones de activación distintas (AF, por sus siglas en inglés), la constitutivamente activa AF-1 localizada en el NH₂ terminal del receptor y la dependiente de ligando AF-2 que reside en el COOH-terminal LBD, localizadas en regiones de los dominios A/B y E respectivamente (Prieto et al., 2003). Ambos dominios AF reclutan un rango de proteínas correguladoras para el receptor de unión al DNA (McEwen, 2002). El dominio E es funcionalmente diverso ya que realiza varias funciones importantes: la unión con el ligando y con proteínas de choque térmico, la dimerización y la interacción con coactivadores. En cuanto al dominio F, se ha demostrado que participa en la función transcripcional del receptor y en su unión con agonistas y antagonistas (Prieto et al., 2003).

Los dos REs comparten un alto grado de homología en la secuencia excepto en su dominio NH₂-terminal y tienen afinidad similar por E₂ y la unión a los mismos ERH en el DNA (Heldring, et al., 2007). La diferencia principal entre RE-α y RE-β consiste en su habilidad para regular la transcripción vía del elemento de respuesta AP-1. RE-α y RE-β pueden formar heterodímeros cuando se expresan en la misma célula. De esta forma, la colocalización endógena de RE-α y RE-β se ha demostrado en el área preóptica del hipotálamo, núcleo de la estría terminal y núcleo medial de la amígdala y probablemente exista en otras regiones de cerebro incluyendo el rafe medio cerebral (McEwen, 2002).

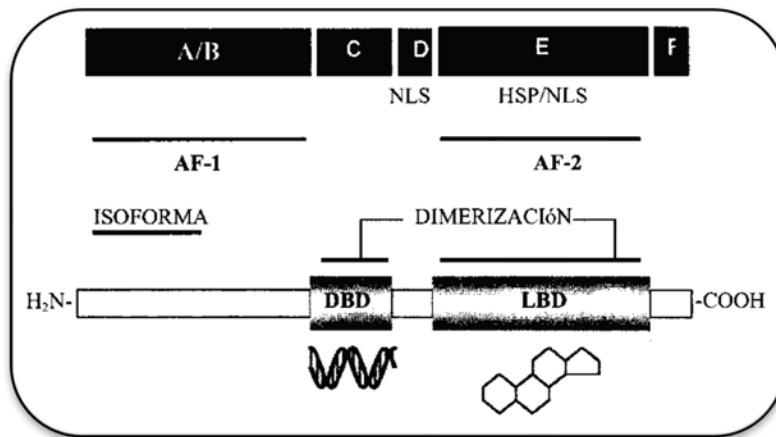


Fig.6. Dominios funcionales de los receptores a hormonas esteroides.

Los REs contienen distintos dominios conservados estructural y funcionalmente a lo largo de la evolución. Se observa el dominio de unión a ligando (LBD) y el más conservado dominio de unión a DNA (DBD). NLS: señal de localización nuclear, HSP: sitio de unión con proteínas de choque térmico. Tomado de Prieto y cols. 2003.

Es bien sabido que los estrógenos son morfógenos y este papel es evidente en la estructura del útero, ovario, glándula mamaria, próstata, pulmón y cerebro. En cuanto a los promotores de algunos genes, particularmente

aquellos involucrados en la proliferación, ER- α y ER- β pueden tener acciones opuestas, un hallazgo que sugiere que la respuesta proliferativa general a E₂ es el resultado de un balance entre la señalización de ER- α y ER- β (Heldring et al, 2007).

Por otro lado, los efectos fisiológicos de la P₄ están mediados por la interacción de la hormona con receptores intracelulares específicos para P₄ (RPs). Se expresan como dos isoformas: RP-A y RP-B (Li y O'Malley, 2003; Singh, 2005). En humanos, las dos transcripciones del RNAm se generan de un gen único mediante la utilización diferencial del promotor (Li u O'Malley, 2005). Estructuralmente, el RP-B difiere del RP-A solo en que el primero contiene una secuencia adicional de 164aa en el extremo amino de la proteína. Al igual que los REs han sido clásicamente descritos como factores de transcripción nuclear, actuando a través de elementos de respuesta a progesterona (ERP) dentro de la región del promotor de los genes blanco para regular su transcripción (Connelly et al., 2002; Singh, 2005). Como factores de transcripción activados por ligando, ambas isoformas contienen un DBD, el cual está flanqueado en el extremo amino terminal por una AF-1 y en el extremo carboxilo terminal por una región bisagra que contiene señales de localización nuclear así como un LBD que contiene un segundo AF (AF-2). Un tercer AF (AF-3) se localiza dentro de la región amino terminal específica de la isoforma B (Li y O'Malley, 2003) **(Fig. 7)**.

Otras variantes de RP se han descrito en diferentes reportes. Una tercera isoforma de RP, RP-C se ha identificado en algunos tejidos incluyendo las células deciduales. PR-C es una forma truncada a nivel N-terminal y es restringido principalmente a la fracción citosólica. Las variantes de RP codificadas con transcripciones carentes de uno o más exones también se han aislado de células normales y malignas de mama. Estas variantes "anormales pueden modificar la acción de la P₄ sirviendo como señuelos

para RP-A y RP-B haciendo menos eficientes las capacidades transcripcionales de estas isoformas (Li y O'Malley, 2003).

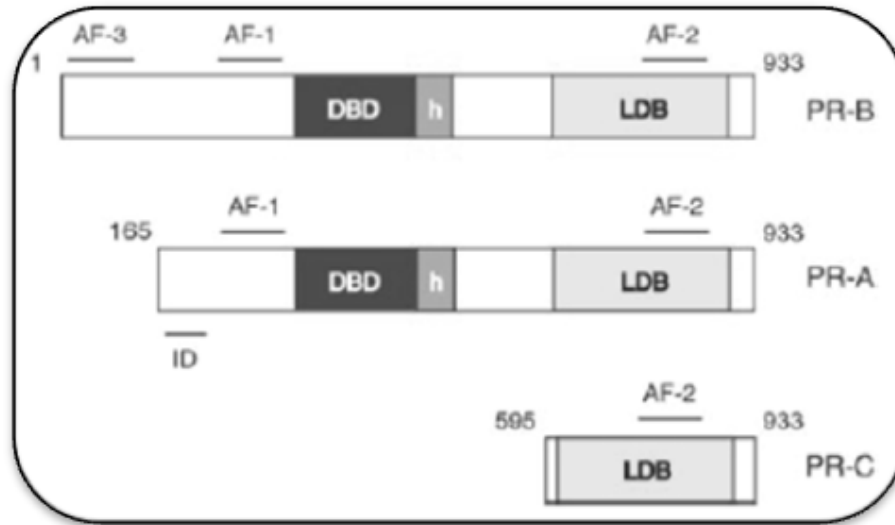


Fig.7. Dominios funcionales e isoformas de los receptores a progesterona. Se observa el dominio de unión a ligando (LDB) y el más conservado dominio de unión a DNA (DBD). La isoforma A carece de los primeros 164 aminoácidos presentes en la isoforma B. AF, Función de activación. Tomado de Li y O'Malley, 2003.

La expresión de ambas isoformas se conserva en roedores y humanos y coincide espacial y temporalmente en tejidos reproductivos femeninos. Sin embargo, la proporción individual de las isoformas varía en los tejidos reproductivos como una consecuencia del desarrollo y el estado hormonal y durante la carcinogénesis (Connely et al., 2002).

La isoforma RP-A ha demostrado que ejerce control negativo sobre la transcripción mediada por RP-B así como aquella regulada por RE- α y los receptores para glucocorticoides (Singh, 2005). Sin embargo, la interacción

entre los dos receptores puede no solo resultar en transrepresión sino que puede ser cooperativa para regularse naturalmente entre sí (Singh, 2005).

Los RPs se han identificado en el SNC y el hueso (Loose y Stancel, 2003). Estos receptores pertenecen a la familia de factores de transcripción con dedos de Zinc activados por ligando y presentan una estructura modular de seis dominios funcionales al igual que los REs (Camacho, 2003). En SNC, la P₄ se ha implicado en función cognitiva. Sin embargo, el papel esencial de los RPs en estas regiones no ha sido bien confirmado (Conneally, et al., 2002). Al contrario del receptor de estrógenos que requiere un anillo fenólico A para su unión de alta afinidad, el receptor de P₄ le favorece una estructura de anillo Δ^4 -3-ona A (Loose y Stancel, 2003).

MECANISMOS DE NEUROPROTECCIÓN EJERCIDOS POR ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA.

El E₂ y la P₄ son dos hormonas esteroides cuya biología ha sido ampliamente estudiada dentro de los confines de la función reproductiva. Como una consecuencia, los efectos de estas hormonas sobre el cerebro se han enfocado principalmente en el hipotálamo. Evidencia creciente, sin embargo, obliga a reconocer que varias regiones cerebrales extrahipotalámicas, incluyendo la corteza cerebral y el hipocampo, son también blanco importante de estas hormonas (Singh, 2005). De tal manera, las hormonas están involucradas en numerosos aspectos de la función cerebral y produce efectos que van desde la regulación del humor y la cognición hasta la regulación de la supervivencia neuronal. Mientras los estrógenos ejercen efectos neuroprotectores en varios modelos experimentales, el potencial de la P₄ como un agente protector ha sido poco estudiado hasta la fecha (Singh, 2005).

MECANISMOS DE NEUROPROTECCIÓN EJERCIDOS POR ESTRÓGENOS.

Entre los numerosos aspectos de la función cerebral regulados por los estrógenos están sus efectos sobre el humor, cognición y viabilidad neuronal, recientes estudios han proporcionado evidencia para los estrógenos como agentes neuroprotectores mediante diferentes mecanismos que se describen a continuación.

El E₂ protege al cerebro por acción directa sobre la supervivencia neuronal y por acción sobre otros tipos neuronales, tales como células endoteliales, astrocitos y microglia mediante vías desencadenadas por la unión de los estrógenos a su receptor o vías independientes de ligando (Wise, et al., 2001). Se ha encontrado que los estrógenos protegen contra una amplio rango de daños tóxicos incluyendo los generados por radicales libres, excitotoxicidad, toxicidad inducida por β -amiloide e isquemia (Díaz, 2001).

Los efectos neuroprotectores de los estrógenos son multifacéticos e incluyen mecanismos que van de lo químico a lo genómico (Díaz, 2001). Varios mecanismos se han propuesto para explicar cómo el E₂ y los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM's por sus siglas en inglés) pueden proteger el cerebro. El término SERM's describe ligandos sintéticos de los REs, son moléculas no esteroideas que pueden interactuar de manera ambigua con los REs ejerciendo actividades agonistas sobre diferentes órganos, como el sistema cardiovascular, el óseo y nervioso, así como actividades antagonistas sobre otros órganos como útero y mama (Dhandapani y Bran, 2002; Heldring, 2007). Los SERM's más conocidos en la actualidad son Tamoxifeno y Raloxifeno, los cuales son ampliamente utilizados en el tratamiento y prevención de cáncer de mama y osteoporosis, respectivamente (Dhandapani y Bran, 2002).

En los mecanismos propuestos se incluyen los siguientes:

1) Genómico: Mediado por el RE (Dhandapani y Bran, 2002), cuyos efectos hormonales son de instauración lenta y duración prolongada (McEwen y Alves, 1999) **(Fig. 8)**.

2) No genómico: Involucra la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK por sus siglas en inglés) y/o la señalización de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K, por sus siglas en inglés). **(Fig. 9)**

3) Mecanismo independiente de ligando. Mediado por moléculas diferentes a los estrógenos y que terminan en la fosforilación del receptor de estos últimos (Heldring, 2007). Este fenómeno se ha asociado con la neuroprotección contra radicales libres (Toran-Allerand, 1999; Dhandapani y Bran, 2002).

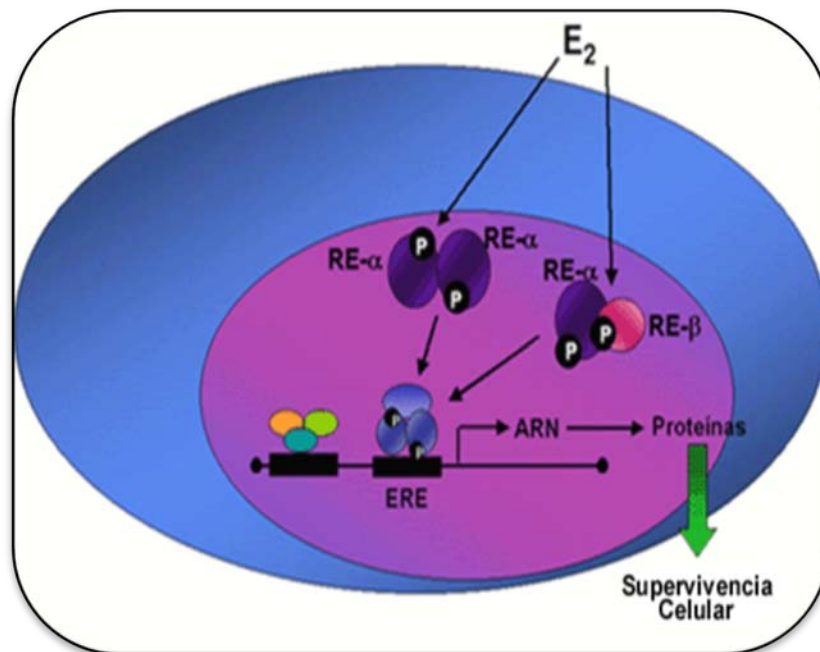


Fig 8. Efectos Genómicos del RE. Activación del RE α o RE β al unir el E₂, fosforilación (P), unión al ERE y activación de la transcripción con la consecuente estimulación de la síntesis de genes (Tomado de Márquez, 2002).

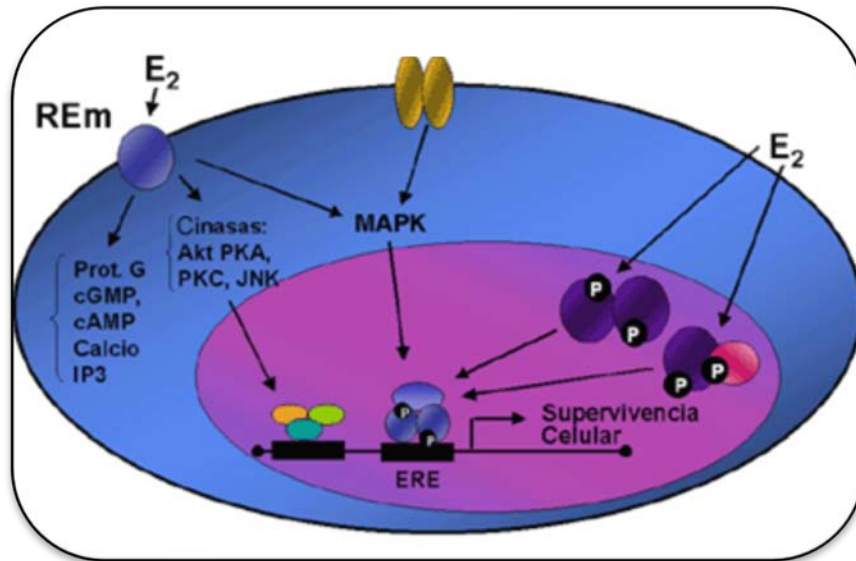


Fig 9. Efectos no genómicos de los estrógenos. El ligando se une a su RE membranario (REm) y activa diferentes señales que pueden estimular la activación de mecanismos genómicos.

Respecto a la *vía genómica*, se sabe que el E₂ a dosis fisiológicas ejerce sus efectos a través de la activación de un RE (principalmente del RE- α) y transcripción génica subsecuente. Los genes precisos regulados por E₂ para ejercer su efecto neuroprotector no han sido identificados, pero E₂ participa en la regulación de la familia de genes Bcl-2 (antiapoptóticos). La regulación a la alza de Bcl-X1 (una proteína antiapoptótica) se ha reportado en células hipocámpales de CA3, así como en células corticales (Pike, 1999) lo cual se ha relacionado con una reducción en la apoptosis inducida por β -amiloide. En esta vía, los REs unidos a ligando pueden unirse directamente a ERH en los promotores de genes blanco o pueden interactuar, en la llamada vía encadenada (Heldring, 2007), con otros complejos de factores de transcripción como Fos/Jun (como parte del complejo coactivador Fos/Jun) e influenciar la transcripción de genes cuyos promotores contienen ERE. La activación dependiente de ligando provoca un cambio estructural en el receptor que permite la disociación de las proteínas de choque térmico y que

activa al receptor, expone la región que le permite dimerizarse (**Fig. 10**), resultando en una estructura con alta afinidad por los ERE (Prieto, et al., 2003), esto conduce al reclutamiento de una variedad de correguladores tales como RIP140,160, 80, ERAP 140, 180, TIF-2 y SRC-1 (Díaz, 2001) por medio del dominio E hacia el receptor en un complejo cuya función crítica es la acetilación de histonas que relaja la hélice de DNA y permite la interacción con los ERE y facilita el reclutamiento de la maquinaria transcripcional de RNA polimerasa II hacia la secuencia promotora (McCarthy, 2008) (**Fig. 11**).

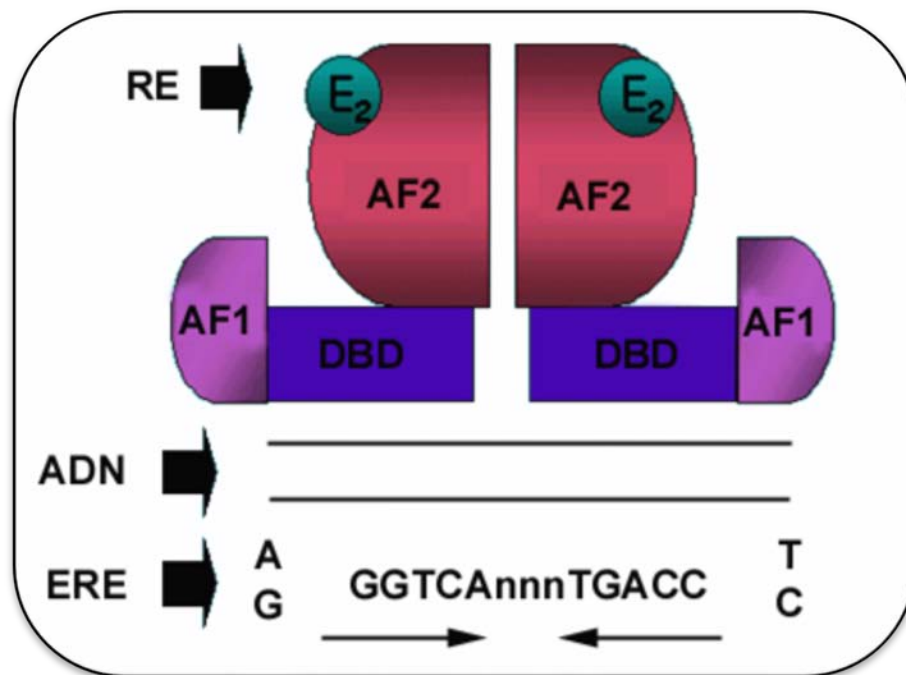


Fig. 10. Homodímero del RE en unión al ADN. Al unir la hormona el RE es activado y se dimeriza antes de unirse al ADN en la región específica o ERE. RE. Receptor de estrógenos. ERE. Elementos de respuesta a estrógenos; AF1, AF2. Función de activación 1 y 2; DBD. Dominio de unión a DNA (Tomado de Márquez, 2002).

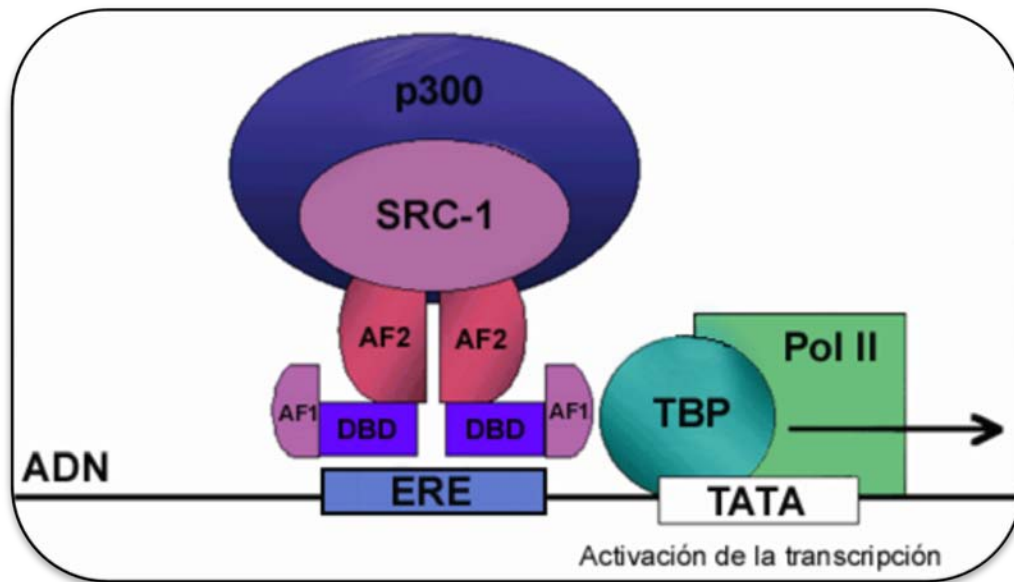


Fig. 11. Complejo de iniciación de la transcripción. El RE dimerizado se une a las proteínas coactivadoras SRC-1 y CBP p300 para formar junto con otras proteínas el complejo de iniciación de la transcripción que da paso a la síntesis de RNAm (Tomado de Márquez, 2002).

Además de los efectos protectores mediados por la transcripción genética a largo plazo, el E_2 es capaz de inducir la activación de diversas rutas de señalización celular que puede ocurrir en segundos o minutos después de la administración de E_2 (Díaz, 2001; Heldring, 2007). Estos mecanismos *no genómicos* pueden iniciarse en la membrana o en el citoplasma e incluyen activación de cinasas y fosfatasa que incrementan el flujo de iones a través de la membrana plasmática. Los receptores de membrana producen efectos no genómicos inmediatos desencadenando diferentes cascadas de señalización, de tal forma que las modificaciones en la transcripción moduladas por los receptores nucleares, puede ser regulada positiva o negativamente por los segundos mensajeros dependientes de la activación de RE membranales (Díaz, 2001). Actualmente se han propuesto varios mecanismos para explicar la neuroprotección inducida por estrógenos. Los

más conocido de estos mecanismos son la activación de la vía de señalización MAPK y la vía proteína cinasa B (Akt, por sus siglas en inglés)/PI3-K. La primera conduce a un incremento en la fosforilación de la cinasa regulada por señales extracelulares 1 (ERK1, por sus siglas en inglés) importante para regular la supervivencia celular (Díaz, 2001), el E₂ demostró que protege neuronas del hipocampo contra excitotoxicidad por medio de esta vía (Dhandapani y Brann, 2002). La segunda vía implica la fosforilación de Akt por medio de PI3-K, cuya activación es crucial para el efecto protector del E₂ contra excitotoxicidad por glutamato así como protección de muerte celular inducida por acumulación de β -amiloide en células de hipocampo (Dhandapani y Brann, 2002).

Finalmente, se ha descrito que existen vías independientes de ligando para activar a los RE. La señalización del factor de crecimiento (GF, por sus siglas en inglés) conducen a la activación de cinasas que pueden fosforilar y por lo tanto, activar los REs o corre reguladores asociados en ausencia de ligando (Dhandapani y Brann, 2002; Heldring, et al., 2007).

Es bien conocido que los estrógenos influyen diferentes aspectos de la estructura y función cerebral (Sherwin, 2006). Los hallazgos en investigación básica que proveen la relación más fuerte de un efecto benéfico de los estrógenos sobre las capacidades cognitivas en mujeres, incluyen su habilidad para incrementar las espinas dendríticas en el hipocampo, su habilidad para incrementar la concentración de ChAT y sus numerosos efectos neurotróficos (Gibbs, 1998; 2010; Díaz, 2001), así como su capacidad para proteger contra un amplio rango de daños tóxicos incluyendo la producción de radicales libres (McEwen, 1999; Díaz, 2001; Dubal, 2001), excitotoxicidad y toxicidad generada por β -amiloide (Díaz, 2001; Villarroya-Pastor, 2001; Wise, et al., 2001) e isquemia.

Diferentes ensayos clínicos han sido desarrollados (Díaz, 2001; Sherwin, 2005; Vearcombe, 2009). El más conocido es la iniciativa de salud de la mujer de los institutos nacionales de salud (WHINIH, por sus siglas en inglés), la cual evalúa el papel de la TRH a largo plazo (con seguimiento a seis años) sobre los síntomas y la progresión de la EA en mujeres de 50-79 años, sus resultados permitieron concluir que los estrógenos son neurotróficos y neuroprotectores contra daños tóxicos asociados con EA en neuronas del CBA, hipocampo y corteza (Díaz, 2001).

Los estrógenos también mejoran la perfusión cerebral la cual disminuye significativamente tras la menopausia (Wise et al, 2001; Villarroja-Pastor, 2001). Existe además una acción recíproca entre estrógenos y neurotrofinas para la síntesis de proteínas necesarias para la plasticidad neuronal (McEwen y Alves, 1999).

MECANISMOS DE NEUROPROTECCIÓN EJERCIDOS POR P₄

Por su parte, la P₄ modula numerosas funciones celulares en el SNC para coordinar la fisiología y la reproducción. El modelo clásico de la acción de la P₄ asume que estos efectos neurales están mediados principalmente mediado por sus receptores intracelulares actuando como reguladores transcripcionales en neuronas sensibles a esteroides, modulando genes y tareas genómicas (Li y O'Malley, 2003).

La P₄ ejerce sus acciones a través de varios mecanismos clasificados como genómicos o clásicos y no genómicos o no clásicos (Camacho, 2003) como se describió anteriormente para los estrógenos, los primeros, involucran cambios en la expresión génica y son mediados por RP mientras que los últimos implican modificaciones a nivel de membrana celular y están relacionados con los efectos rápidos de la hormona (Camacho, 2003).

Han sido descrita una variedad de mecanismos no genómicos para P₄, éstos incluyen interacción con: a) RP localizados en la membrana celular, b) canales iónicos tales como canales de Ca⁺² y K⁺, c) sitios de modulación localizados en receptores de neurotransmisores tales como receptores GABA_A y d) receptores de neurotransmisores y factores de crecimiento acoplados a proteína G (**Fig. 10**) (Camacho, 2003).

La creciente lista de sistemas de transducción de señales activado por P₄ incluye AMPc/PKA, MAPK (ERK1/2), y la vía PI-3K/Akt, estos segundos mensajeros apoyan recientes descubrimientos de receptores de membrana acoplados a proteínas G y que pueden mediar una vía no genómica (Singh, 2005).

La regulación de la expresión génica por P₄ ocurre como sigue: primero P₄ se une a su receptor, el cual en su forma no ligada se asocia con proteínas tales como las de choque térmico HSP90 y HSP70 (por sus siglas en inglés) y las proteínas FKB51, FKB52 y p23; después el RP se disocia de las proteínas chaperonas y se dimeriza con otra molécula de RP, el dímero después se fosforila y forma complejos con cofactores tales como el coactivador SRC-1 o el correpresor SMRT que modifican la organización de la cromatina; RP interactúa con cortas secuencias de DNA específicas conocidas como elementos de respuesta a P₄ (ERP), esta interacción induce además fosforilación de RP y recluta la maquinaria basal de transcripción involucrada en la expresión génica (**Fig. 11**). De manera interesante, neurotransmisores tales como DA y algunos factores de crecimiento que estimulan la producción de AMPc y fosforilación intracelular, pueden activar RP en ausencia de ligando (Camacho, 2003).

Aunque los RE's y RP's pertenecen a diferentes subfamilias de receptores nucleares, existe considerable *cross-talk* entre las vías de señalización de los estrógenos y progestinas (Nilsen y Díaz, 2002)

MENOPAUSIA.

La función ovárica se caracteriza fundamentalmente por ser limitada en el tiempo en virtud de lo acotado de la reserva folicular ovárico; el número de folículos primordiales es de alrededor de 7 millones en la semana 20 de gestación y tal solo de 2 millones en el momento del nacimiento. Entre el nacimiento y la menarquia, cuando comienza la actividad funcional de la gónada femenina, se habrán perdido un total de 1.600.000 folículos primordiales aproximadamente, restando a la función genital normal tan solo 400.000 que se gastarán indefectiblemente a lo largo de los 400 a 450 ciclos de que dispone la mujer entre la menarquia y la menopausia.

La menopausia constituye un evento único en la vida de las mujeres y corresponde a la última menstruación. Se presenta debido a la disminución de la función hormonal y gametogénica de los ovarios y marca la transición entre la etapa reproductiva y la no reproductiva. El cese de la menstruación como resultado de la pérdida de la función ovulatoria es un suceso natural, parte del proceso normal de envejecimiento (NOM 035-SSA2-2002). En las mujeres mexicanas la menopausia ocurre en promedio a los 49 años de edad, siendo precedida por un periodo de duración variable durante el cual pueden presentarse los síntomas y signos del síndrome climatérico, que en ocasiones demandan atención médica (NOM 035-SSA2-2002).

En esta etapa se observa la mayor prevalencia del síndrome climatérico, debido a una disminución gradual de la función ovárica. El número de folículos primordiales se reduce, presentando una respuesta pobre o nula al estímulo de las gonadotropinas hipofisarias y por ende, la producción de E_2 y P_4 se reduce. El hipoestrogenismo es la causa de la mayoría de las alteraciones del síndrome climatérico que ocurren en este periodo: reducción de la fertilidad, alteraciones menstruales, inestabilidad vasomotora,

alteraciones del tracto genitourinario, cambios psicológicos y en la sexualidad. Por otra parte, varios padecimientos crónico-degenerativos como la osteoporosis, la enfermedad cardiovascular aterosclerosa, y algunas alteraciones neurológicas (NOM 035-SSA2-2002) como la EA (Bonomo et al, 2009) inciden con más frecuencia durante la etapa postmenopáusica, originando deterioro de la calidad de vida e incremento de la morbi-mortalidad general (NOM 035-SSA2-2002).

El periodo de la perimenopausia incluye el tiempo de transición hormonal previo (transición menopáusica), durante y posterior a la menopausia; suele empezar a mediados o finales del quinto decenio de vida y su duración varía pero por lo general es de siete años (Scoth y Danforth, 2005). El incremento notable de la esperanza de vida al nacimiento en la población, particularmente de las mujeres, que ocurrió en la última mitad del siglo XX, condicionó que un mayor número de mexicanas alcancen la edad promedio de la menopausia (NOM 035-SSA2-2002) y pasen una importante parte de su vida en la condición postmenopáusica (NOM 035-SSA2-2002; Hurd et al., 2004). Por este motivo, la Terapia de reemplazo hormonal (TRH) es una de las preocupaciones primarias de muchos servicios de atención médica.

Se define menopausia como el cese permanente de la ovulación y de la menstruación. Se diagnostica de manera retrospectiva, una vez que han transcurrido 12 meses consecutivos de amenorrea (NOM 035-SSA2-2002; Hurd et al., 2004; Sociedad de Ginecólogos y Obstetras de Canadá, 2006) y tiene correlación fisiológica con la declinación de la secreción de estrógenos por pérdida de la función folicular (Hurd et al, 2004). Actualmente puede definirse más precisamente la menopausia como amenorrea con signos de hipoestrogenemia y un aumento de la FSH, que rebasa 40 UI/L (Scoth y Danforth, 2005).

Durante el periodo de menopausia, hasta 75% de las mujeres pueden empezar a experimentar una variedad de síntomas aunque no todas los sienten al mismo grado. Algunas mujeres virtualmente no tendrán síntomas mientras que otras sentirán un impacto significativo sobre su calidad de vida (Sociedad de ginecólogos y obstetras de Canadá, 2006).

Clínicamente hablando, los síntomas causados por la disminución de las hormonas ováricas en una mujer que empieza con el periodo de perimenopausia caen dentro de dos categorías: síntomas vasomotores y urogenitales (Sociedad de ginecólogos y obstetras de Canadá, 2006) y comprenden los siguientes:

Bochornos, oscilaciones del humor, irritabilidad, ansiedad, dificultad para concentrarse y problemas con la memoria, baja autoestima, depresión; adelgazamiento de los tejidos que cubren la vejiga y el tracto urinario, resultando en un control disminuido del esfínter vesical y susceptibilidad incrementada a infecciones recurrentes de la vía urinaria e infecciones vaginales, disminución de la lubricación y sensibilidad vaginal, sequedad vaginal por atrofia de ésta lo cual puede producir dispareunia; disminución o desaparición de libido; insomnio, apnea del sueño, fatiga, osteoporosis y dolor de articulaciones (Sociedad de ginecólogos y obstetras de Canadá, 2006).

MENOPAUSIA Y DETERIORO COGNITIVO.

Después de la menopausia, decaen los niveles plasmáticos del E_2 y la estrona. Se ha sugerido que esta privación estrogénica aumentaría el riesgo en las mujeres de desarrollar la EA y, a la inversa, la sustitución estrogénica

podría reducir este riesgo; no obstante, falta una relación concluyente de causa-efecto entre estos datos (Villarroya, 2001).

El hecho de que la EA aparezca relacionada con la edad y con mayor frecuencia en mujeres que en varones parece implicar al déficit de las hormonas ováricas en la génesis de la demencia. Esta hipótesis se soporta en la evidencia de que el declinar del peso del cerebro se inicia en las mujeres a partir de los 50-60 años, mientras que en los varones dicha disminución se manifiesta a partir de los 60-70 años. Más concretamente, las mujeres sanas, en la posmenopausia, experimentan una atrofia y una pérdida de volumen en el hipocampo y en el lóbulo parietal mayor que la que presentan los varones a la misma edad; en ellos, dichos cambios aparecen una década más tarde. Este hecho se pone en evidencia mediante la medición con técnicas de neuroimagen (resonancia magnética) de las áreas cerebrales descritas. Las mujeres también manifiestan una disminución en el consumo de glucosa en el hipocampo. En ausencia de estrógenos, la hipoglucemia es mucho más tóxica para las células cerebrales. En el hipocampo, que es particularmente sensible a la hipoglucemia, el transporte de glucosa depende de los estrógenos (Villarroya, 2001).

La transición menopáusica es una fase crítica en la vida de la mujer donde ocurren cambios biológicos desfavorables que podrían predisponer a un riesgo incrementado de padecer neurodegeneración. De forma colectiva, la prevalencia elevada de la EA en la población femenina podría depender al menos en parte de la presencia de factores de riesgo biológicos cuya contribución al desarrollo de la enfermedad ocurre solo en la presencia de posibles desencadenantes dependientes de la edad, tales como el depósito de β amiloide (Bonomo et al, 2009) Así pues, la conjugación de factores ambientales y genéticos predispone de forma multifactorial a un individuo dado al desarrollo de la enfermedad. Hay evidencia acumulada de que en las

mujeres uno de estos factores de riesgo es la privación de estrógenos en la menopausia (Villarroya, 2001).

El rol de los estrógenos en la EA se ha investigado en una variedad de modelos in vivo e in vitro. En estos estudios, se ha demostrado que los estrógenos son potentes agentes neuroprotectores. El soporte inferencial del papel protector de los estrógenos en la EA descansa en la observación de que la función cognitiva se mejora (Zhao y Díaz, 2006; Bonomo, 2009) y/o se reduce el desarrollo de la EA (Henderson et al, 2000b; Zhao y Díaz, 2006) mediante la TRH en mujeres postmenopáusicas (Bonomo, 2009).

Sin embargo se ha demostrado que el efecto protector de los estrógenos se observa cuando se administra la TRH en etapa temprana de la menopausia (alrededor de los 49 y 60 años) mientras que se observan efectos contrarios cuando se administra después de los 60 años. Esto puede ser explicado porque los efectos de los E sobre el cerebro son probablemente preventivos y cuando ya han ocurrido lesiones vasculares o degenerativas, los E no las pueden revertir (Rocca et al, 2009).

La combinación de evidencia científica de estudios observacionales y pruebas clínicas sugiere que los estrógenos son neuroprotectores, sin embargo, los efectos neuroprotectores son dependientes de la edad, tipo de menopausia y estado de la menopausia (Rocca et al, 2009).

CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS.

Las Cdk's son las subunidades catalíticas de una amplia familia de serina/treonina cinasas heterodiméricas (Malumbres y Barbacid, 2005; Morgan, 2007; Arendt, 2008). Por definición, la característica principal de las Cdk's es que se encuentran inactivas en su forma monomérica y que

para su activación requieren asociación con una subunidades reguladoras específicas (Harper y Adams, 2001; Malumbres y Barbacid, 2005; Morgan, 2007) que son moléculas sintetizadas y degradadas durante cada ciclo celular por lo que se les ha llamado ciclinas (Malumbres y Barbacid, 2005). En la mayoría de los casos, la activación completa también requiere la fosforilación de un residuo de Treonina cercano al sitio cinasa activo (Morgan, 2007). Cabe mencionar que la Cdk5, cuya regulación será detallada posteriormente, no requiere de una ciclina como subunidad reguladora sino de las proteínas p35 y p39 cuya estructura aparentemente no es similar a la de las ciclinas (Morgan 1995).

TIPOS DE CDK'S.

De acuerdo a las versiones previas del genoma de ratón y del humano, hay 11 genes que codifican Cdk's y otros 9 genes codifican proteínas tipo Cdk con la estructura primaria conservada (Malumbres y Barbacid, 2005). Actualmente la nomenclatura de estas proteína cinasas las ha numerado en orden ascendente de acuerdo a su descubrimiento desde Cdk1 hasta Cdk11 (Malumbres y Barbacid, 2005; Arendt, 2008).

En las células en división, las Cdk's regulan la proliferación, diferenciación, senescencia y apoptosis (Arendt, 2008). Las células animales por ejemplo, contienen al menos nueve Cdk's, solo cuatro de las cuales [Cdk1(aka Cdc2), 2, 4 y 6] están involucradas directamente en el control del ciclo celular. Otro miembro de la familia (Cdk7) contribuye indirectamente mediante la acción como una cinasa activadora de Cdk (CAK, por sus siglas en inglés) que fosforila otras CDKs (Morgan, 2007; Arendt, 2008). Además las Cdk's (Cdk2, Cdk7, Cdk8, Cdk9, Cdk11) (Arendt, 2008) son componentes de la maquinaria que controla la transcripción génica (Arendt, 2008) a través de la RNA polimerasa II (Morgan 2007) y otras están involucradas en el control del crecimiento de las neuronas, migración neuronal, señalización de

neurotransmisores (Cdk4, Cdk5, Cdk11) (Arendt, 2008), la diferenciación de células nerviosas (Cdk5) (Morgan, 2007; Arendt, 2008), (Cdk2, Cdk6, Cdk9) (Arendt, 2008) y muerte neuronal (Cdk1, Cdk2, Ck4, Cdk5, Cdk6, Cdk11) (Arendt, 2008).

CICLINAS.

Las ciclinas son una familia de diversas proteínas cuya característica principal es que se unen y activan miembros de la familia de Cdk's. La mayoría de las ciclinas presenta cambios drásticos en su concentración durante el ciclo celular lo cual ayuda a generar las oscilaciones en la actividad de las Cdk's lo cual es el fundamento para el control del ciclo celular (Morgan, 2007).

La conexión bioquímica entre Cdk's y ciclinas fue hecha en 1989 cuando los investigadores reportaron la asociación de Cdk1 con la Ciclina A y Ciclina B. Más recientemente el análisis del genoma humano identificó al menos 29 genes que codifican proteínas relacionadas que forman un dominio de 150 residuos de aminoácidos denominados "la caja ciclina". Este dominio está formado por cinco regiones helicoidales y es responsable de la unión a sus proteínas blanco incluyendo las Cdk's. Aunque todas estas proteínas se llaman genéricamente ciclinas, para la mayoría de ellas no se sabe si son sintetizadas y destruidas de manera cíclica (Malumbres y Barbacid, 2005).

Se han reportado diez distintos subtipos de ciclinas [A1, A2, A3, B, B2, D1, D2, D3, E1, E2 y F] que contribuyen directamente al proceso de división celular (Harper y Adams, 2001). Las ciclinas tipo D interactúan preferentemente con Cdk4 y Cdk6, estos complejos funcionan principalmente durante la fase G1 del ciclo celular. La síntesis y estabilidad de las ciclinas tipo D está controlada por el factor del crecimiento y la activación de las

Cdk's tipo D está limitado a la progresión del ciclo en la fase G1 en fibroblastos. Las ciclinas tipo E forman complejos activos con Cdk2 y la abundancia de estos complejos hace un pico durante la transición G1/S. Por ejemplo, la ciclina E y Cdk2 son necesarias para la iniciación de la replicación del DNA. La ciclina A puede formar complejos con Cdk1 y Cdk2 durante la fase S y G2, y estos complejos tienen un rol en la replicación y el paso a través de la fase G2. Las ciclinas tipo B forman complejos con Cdk1 durante la fase G2 y estos complejos coordinan muchos de los eventos requeridos para la mitosis. La participación de Cdk3 y las ciclinas F aún está indefinido (Harper y Adams, 2001).

Las ciclinas pueden ser divididas en cuatro clases basadas principalmente en el momento de su expresión y sus funciones en el ciclo celular. Tres de estas clases: ciclinas G1/S, ciclinas S y ciclinas M, están involucradas en el control de los eventos del ciclo celular. La cuarta clase, ciclinas G1, está involucrada en el control de la entrada al ciclo celular en respuesta a factores externos (Morgan, 2007).

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS CDK'S

Mucho de lo que se conoce actualmente acerca de la activación de las Cdk's viene del análisis de los complejos Cdk2/Ciclina A y Cdk4/ciclina D. Estos dos complejos sirven como prototipos para las principales clases de vías que controlan la actividad de Cdk (Harper y Adams, 2001).

Todas las proteínas cinasas tienen estructura terciaria comprometiendo un pequeño lóbulo aminoterminal y un lóbulo grande carboxilterminal. El ATP encaja perfectamente en la hendidura formada por ambos lóbulos de tal forma que las fosfatasas están orientadas hacia la boca de la hendidura (Morgan, 2007).

La proteína sustrato se une a la entrada de la hendidura, interactuando principalmente con la superficie del lóbulo carboxilo terminal. Cerca los residuos catalizan la transferencia del γ -fosfato terminal del ATP hacia un grupo hidroxilo en la proteína sustrato (Morgan, 2007).

Las Cdk's tienen la misma estructura de otras proteínas cinasas pero con dos modificaciones que la hacen inactiva en ausencia de ciclina. Primero, una curva flexible grande -la curva T o curva de activación- la cual contiene el sitio de fosforilación para la actividad (Harper y Adams, 2001), sale del lóbulo carboxilo terminal para bloquear la unión de la proteína sustrato a la entrada del sitio activo de la hendidura. Segundo, en la Cdk inactiva varias cadenas laterales de aminoácidos en el sitio activo están desalineadas respecto a sus posiciones en la forma activa (Harper y Adams 2001, Morgan, 2007) de tal manera que los fosfatos del ATP no están orientadas idealmente para la reacción cinasa. Por lo tanto, la activación de Cdk requiere cambios estructurales extensos en su sitio activo (Morgan, 2007).

Por ejemplo, después de la unión de la Ciclina A, la actividad intrínseca de Cdk2 se incrementa hasta 5 veces. Esta activación parece deberse a los cambios conformacionales en la proteína Cdk2 inducidos por la unión de la ciclina que altera las posiciones de los residuos Asp145, Glu51 y Lys33. Estos residuos funcionan en la orientación del ATP para la catálisis. En adición, la curva T sufre un gran cambio conformacional que la desplaza de la hendidura de unión a sustrato. En el segundo paso, el residuo Thr160 (Thr161 en Cdk1) se fosforila por una Cinasa de activación de Cdk (CAK) conduciendo a un incremento de la activación de 100 veces (Harper y Adams, 2001).

La principal consecuencia de la fosforilación de Thr160 es que la curva T se mueve del sitio de unión al péptido sustrato, una estructura que está estabilizada por puentes hidrógeno entre las cadenas laterales y los fosfatos de Thr160 (Harper y Adams, 2001).

Dos alfa hélices hacen una contribución particularmente importante para el control de la actividad de las Cdk (**Fig 12**). La hélice PSTAIRE (también conocida como la hélice 1) altamente conservada en el lóbulo amino terminal, interactúa directamente con la ciclina y mueve interiormente la unión de la ciclina causando la reorientación de los residuos que interactúan con los fosfatos de la ATP. La hélice pequeña L12 también cambia la estructura para convertirse en una cadena beta y contribuye con la reconfiguración del sitio activo y de la curva T (Morgan, 2007).

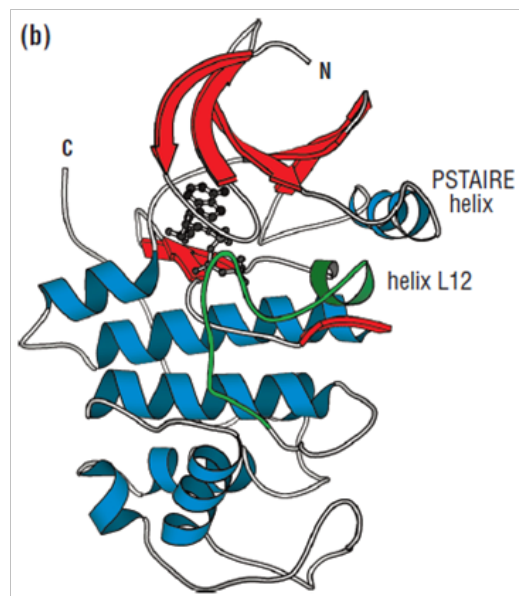


Fig.12. Estructura terciaria de Cdk2 humana. Determinada por cristalografía de rayos X. Como otras proteínas cinasas, Cdk2 está compuesta de dos lóbulos: amino terminal (rojo) y carboxilotermino (azul). Se muestra el sustrato ATP, localizado en la profundidad de la hendidura entre ambos lóbulos. Tomada de Morgan, 2007.

La unión de la ciclina por sí sola no es suficiente para activar las Cdk's involucradas en el control del ciclo celular. La activación completa y la función normal de las Cdk's en la célula también requieren la fosforilación de un residuo treonina adyacente al sitio activo de la cinasa, catalizado por enzimas llamadas CAK's. La actividad de estas cinasas se mantiene constante a un nivel elevado a través de todo el ciclo celular y no está regulada por ninguna vía de control conocida. En adición, la fosforilación en mamíferos sólo puede ocurrir una vez que la ciclina se ha unido a la Cdk, por lo tanto, la fosforilación puede ser vista como una modificación post-transduccional que es requerida para la función de la enzima (Morgan, 2007). Aunque el tiempo de unión de a ciclina puede ser suficiente para controlar el tiempo de activación de las Cdk, numerosas vías de regulación diferentes se utilizan para proveer un control adicional. Esto incluye fosforilación, inhibidores de las uniones estrechas Cdk-ciclina, ensamble regulado de holoenzimas y proteólisis de ciclinas e inhibidores de Cdk's. Estas formas de regulación, algunas de las cuales aún son incomprensibles, son el punto final de vías de señalización extrínseca y/o intrínseca encauzada para coordinar decisiones proliferativas o antiproliferativas (Harper y Adams, 2001).

Mientras que la activación de la fosforilación no está regulada, dos fosforilaciones inhibitoras tienen funciones importantes en la regulación de la actividad de las Cdk's. Éstas ocurren a nivel de dos residuo de tirosina (Tyr 14 y 15 en humano) cuya localización es en el techo del sitio de unión al ATP de la cinasa y su fosforilación probablemente inhibe la actividad porque interviene con la orientación de los grupos fosfato. Una enzima responsable de dicha fosforilación es Wee1 o Myt1 y la desfosforilación de estos sitios se lleva a cabo por fosfatasas de la familia Cdc25. Wee1 y Cdc25 también son blancos importantes de regulación de la actividad de Cdk en respuesta a factores tales como el daño del ADN (Morgan, 2007).

ORIENTACIÓN DE LAS CICLINAS HACIA SU SUSTRATO.

La especialización funcional de las ciclinas ayuda a asegurar la progresión ordenada a través de los pasos del ciclo celular. No está claro cómo una sola ciclina conduce a la secuencia de eventos correcta de las fases S y M. una posibilidad es que la especificidad de los complejos Cdk/ciclina es dependiente de la concentración y un complejo que promueve la fosforilación de los sustratos en la fase S a cierta concentración, también promueve la fosforilación de los sustratos en fase M cuando se acumula a concentración mayor. Otra explicación es que los algunos sustratos de Cdk llegan a estar disponibles para fosforilación sólo durante un estado específico durante el ciclo celular (Morgan, 2007).

En algunos casos, es claro que la especialización funcional de las ciclinas es debida a su interacción con un subgrupo específico de sustratos de Cdk. La especificidad por el sustrato de las ciclinas S depende de una región llamada "parche hidrofóbico" el cual se une con moderada afinidad a proteínas sustrato que contienen una secuencia hidrofóbica complementaria conocida como el residuo RXL. La interacción incrementa la afinidad sustrato-cinasa y por lo tanto incrementa la proporción de fosforilación del sustrato (Morgan, 2007).

El parche hidrofóbico no sólo se une al sustrato sino que también interactúa con proteínas que inhiben la actividad de Cdk. Varias proteínas inhibidoras de las Cdk's se unen al parche hidrofóbico sobre la ciclina, previniendo así la unión y fosforilación de los sustratos de Cdk (Morgan, 2007).

Algunas ciclinas tienen secuencias de información que las orienta a ellas y a sus Cdk's hacia localizaciones subcelulares específicas proveyendo otro

mecanismo por el cual una ciclina puede dirigir a su subunidad catalítica hacia el sustrato correcto (Morgan, 2007).

SUBUNIDADES INHIBIDORAS DE CDK'S

La actividad de las Cdks se reula de manera negativa por los inhibidores de Cdk's, los cuales se unen directamente a las Cdk's o a los complejos Cdk/ciclina (Arendt, 2008). Basado en sus características estructurales, estos inhibidores se agrupan en dos familias: la familia de los inhibidores de Cdk4 (INK4, por sus siglas en inglés) y la familia Cip/Kip (Arendt, 2008; Hernández et al., 2011).

En células con proliferación activa, la mayoría de la actividad de las Cdk's se suprimen en fase G1, resultando en un periodo de transición estable durante el cual el crecimiento celular y otras influencias reguladoras tales como los factores extracelulares, pueden regular la entrada al siguiente ciclo celular (Morgan, 2007).

Los inhibidores de Cdk's (CKI's, por sus siglas en inglés) se expresan de manera dependiente de tejido y se requieren para el arresto adecuado del ciclo celular en respuesta a diferentes señales de diferenciación durante el desarrollo (Harper y Adams, 2001).

Los miembros de la familia Cip (p21, p27 y p57) regulan principalmente la actividad de los complejos Cdk/Ciclina de fase G1. En contraste, los de la familia INK4 (p16, p15, p19 y p18) inhiben específicamente a Cdk4 y Cdk6 (Hernández et al, 2011).

La inhibición está mediada por un cambio conformacional en la cinasa que previene la asociación de las ciclinas y distorsiona el sitio de unión al ATP.

La familia INK4 podría estar involucrada en la regulación de las vías que controlan el crecimiento celular y la proliferación así como la muerte celular. La desregulación de estos inhibidores resulta en proliferación descontrolada y transformación neoplásica o activación de la apoptosis (Arendt, 2008).

En mamíferos, p27 ayuda a gobernar la actividad de Cdk's inhibiéndolas en la fase G1/S y S pero tienen relativamente poco efecto sobre las Cdk's que participan en la fase M (Morgan, 2007).

Así, el incremento de Cdk's G1/S en fase G1 tardía, requiere de la remoción de p27, lo cual se lleva a cabo por una combinación de mecanismos. p27 hace contacto con ambas subunidades: ciclina y Cdk. En particular, una región amino-terminal de p27 se une a la región del parche hidrofóbico de la ciclina mientras que los residuos 60-64 de p27 interactúan extensamente con el lóbulo N-terminal de la Cdk expulsando ATP (Harper y Adams, 2001).

Otros CKI's ayudan a arrestar a la célula en fase G1 en respuesta a señales inhibitoras específicas, por ejemplo, la proteína p21 bloquea las ciclinas G1/S y S en respuesta al daño del ADN (Morgan, 2007).

Aunque Cdk5 comparte muchas características de la regulación del resto de los miembros de su familia, los inhibidores p21 y p27 tienen efecto mínimo sobre Cdk5/p35, soportando la idea de que la interacción con un activador diferente a las ciclinas, le permite escapar de la inhibición por CKI's. La identificación de las proteínas inhibitoras específicas para Cdk5 se mantiene aún desconocida (Dhavan y Tsai, 2001).

La progresión a través de las fases del ciclo celular puede prevenirse mediante inhibidores farmacológicos tales como flavopiridol, el cual inhibe a todas las Cdk's y arresta a las células en la transición G1/S o G2/M; y

roscovitina, la cual muestra selectividad hacia las Cdk's 1, 2, 5, 7 y 9 compitiendo por el sitio de unión al ATP (Hernández et al, 2011).

MECANISMO DE PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR.

El segmento inicial del ciclo celular, la fase G1, es el sitio de integración de señales mitóticas que resultan de la activación dependiente de ligando de receptores de factores de crecimiento e integrinas, lo cual converge en la activación de Cdk's y ciclinas G1 (Arendt, 2008) **(Fig 13)**.

Durante la fase G1, las células incorporan señales ambientales que las conducen a progresar a través del primer punto de restricción, después del cual, las células están comprometidas para dividirse (Hernández et al., 2011).

La actividad resultante de las Cdk's determina si las señales mitogénicas se propagan para inducir la fosforilación de sustratos clave requeridos para la progresión a través de G1 y entrar a la fase S (Arendt, 2008).

La progresión a través de G1 está regulada por un mecanismo complejo que puede involucrar al menos tres Cdk's y sus reguladores: Cdk4, Cdk6 y Cdk2 (Malumbres y Barbacid, 2005) **(Fig 13)**. Cuando las células quiescentes entran en la fase G1, se inducen los genes que codifican ciclinas tipo D en respuesta a señales mitogénicas en conjunto con el estímulo externo apropiado (Arendt, 2008). Los complejos activos de Cdk4 o Cdk6 y las ciclinas tipo D, fosforilan miembros de la familia de la proteína de retinoblastoma (pRb) (Malumbres y Barbacid, 2005; Alendrt, 2008) la cual incluye pRb, p107 y p130 (Malumbres y Barbacid, 2005). Estas proteínas contienen contienen múltiples sitios de fosforilación por Cdk, solo algunos de los cuales son reconocidos por los complejos Cdk4/Ciclina D y/o Cdk6/Ciclina

D (Malumbres y Barbacid, 2005), contribuyendo así con la inactivación de su función represiva. Consecuentemente, el factor de transcripción E2F puede iniciar la transcripción de la ciclina E (Arendt, 2008). En segundo lugar, la familia de ciclina D secuestra al inhibidor de Cdk's p27 del complejo Cdk2/Ciclina E (Malumbres y Barbacid, 2005; Arendt, 2008); la degradación de este inhibidor también puede ser favorecida mediante la fosforilación por el complejo Cdk2/Ciclina E (Malumbres y Barbacid, 2005).

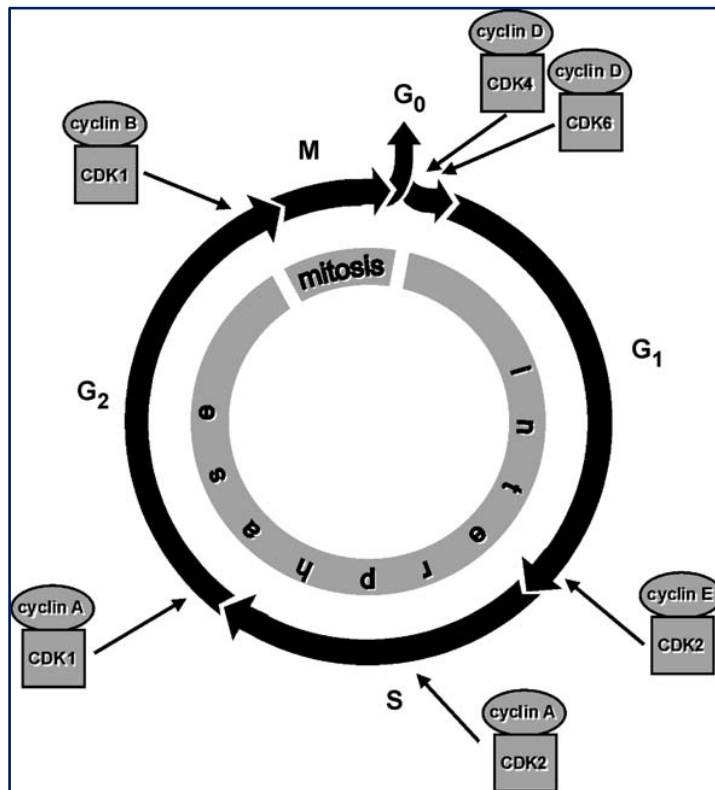


Fig 13. Fases del ciclo celular. Está indicado el sitio de regulación de los complejos Cdk/Ciclina (Tomado de Arendt, 2008).

Se ha demostrado recientemente que Cdk3 también se une a Ciclina C durante la fase G₀ y estimula la fosforilación de pRb en algunas células tumorales de humanos. Debido a que la expresión de las ciclinas C precede a las ciclinas tipo D, se ha propuesto que la inactivación de las proteínas Rb

durante la fase G1 temprana involucra su fosforilación secuencial por Cdk3/Ciclina C y después CDk4/Ciclina D y/o Cdk6/Ciclina D (Malaumbres y Barbacid, 2005).

La primera onda de actividad cinasa dependiente de Ciclinas D es seguida en fase G1 tardía por un incremento en la Ciclina E, la cual se asocia con Cdk2 y cuyo ensamble es independiente de mitógeno. El complejo Cdk2/Ciclina E no sólo es responsable de la transición G1/S sino que también regula la duplicación del centrosoma (Malumbres y Barbacid, 2005; Arendt, 2008). Cdk2 refuerza a Cdk4 para completar la fosforilación de pRb e induce la degradación de p27 (Arendt, 2008). El ciclo celular es ahora irreversible (Hernández et al, 2011) y la célula está comprometida a entrar en fase S (Arendt, 2008).

La vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) tienen un papel clave en la activación de las Cdk's. la cascada clásica involucra la activación secuencial de Ras, Raf-1. MEK y ERK. ERK fosforila y estabiliza a c-Mic, un factor transcripcional que induce la expresión de la ciclina D1 y suprime la expresión de los Cdkl's (Hernández et al 2011).

Una vez que la célula entra en fase S, los complejos Cdk2/Ciclina E necesitan ser silenciados para permitir la re-replicación del ADN. El complejo Cdk2/Ciclina E por sí mismo fosforila a la Ciclina E, la cual es reconocida subsecuentemente como blanco de degradación por una ubiquitina ligasa (SCF-Fbxw7) (Arendt, 2008). Este requerimiento es completado probablemente por rápida degradación de la ciclina E por la ligasa ubiquitina, seguida por su escisión por el proteasoma (Malumbres y Barbacid, 2005). La fosforilación de la Ciclina E marca la transición de la fase S (Arendt, 2008).

La inactivación de pRb también participa promoviendo la transcripción de genes que son necesarios para las fases subsecuentes del ciclo celular, incluyendo aquellos que codifican las Ciclinas tipo A y tipo B. aunque las ciclinas tipo A se acumulan durante la fase S, la síntesis de las Ciclinas tipo B no es evidente sino hasta la transición G2-M. En efecto, modelos actuales proponen que una vez que Cdk2 se ha disociado de la Ciclina E, ésta interactúa con las nuevas ciclinas sintetizadas A1 y A2. Mientras que la Ciclina A2 parece ser ubicua, Ciclina A1 se expresa principalmente en células germinales (Malumbres y Barbacid, 2005).

El complejo Cdk2/Ciclina A fosforila varios sustratos permitiendo la replicación del DNA (Arendt, 2008) tales como factores de transcripción (EsF1, B-Myb), proteínas involucradas en la replicación del ADN (Cdc6, HSSB o RPA, MCM4), reparación del ADN (BRCA1, Ku70), modificación de las histonas (HIRA), proteólisis mediada por ubiquitina (hHR6A o Rad6 o Ubc2 y Cdc20) y puntos de restricción del ciclo celular (p53, p21 y MDM2) (Malumbres y Barbacid, 2005).

Al final de la fase S, las ciclinas tipo A se asocian con Cdk1 (Malumbres y Barbacid, 2005, Arendt, 2008). Los complejos Cdk2/Ciclina A y Cdk1/Ciclina A tienen varios sustratos tales como las proteínas involucradas en la replicación del ADN (MCMs, Cdc7 o la ribonucleótido reductasa R2) así como otras proteínas que participan en el control del ciclo celular (pRb, p53, BARD1 y BRCA2). Durante la fase G2, las ciclinas tipo A se degradan por ubiquitinación mientras que las ciclinas tipo B se sintetizan activamente (Malumbres y Barbacid, 2005). Como consecuencia Cdk1 se une a ciclinas tipo B, una asociación que se cree que es esencial para disparar la mitosis (Malumbres y Barbacid, 2005). En efecto, aunque la activación secuencial de diferentes Cdk's está bien establecida en la progresión del ciclo celular en mamíferos, un reporte reciente indica que Cdk1 es el único factor esencial

para la progresión el ciclo celular. En ratones carentes de Cdk2, 3, 4 y 6, la Cdk1 puede unirse a todas las ciclinas y ejecutar todos los eventos necesarios para la división celular durante la organogénesis (Hernández et al., 2011).

Los complejos Cdk1/Ciclina B están involucrados también en diferentes procesos estructurales y reguladores, tales como la condensación de la cromatina, fragmentación del aparato de Golgi y rotura de la lámina nuclear. Otros sustratos incluyen proteínas de unión a microtúbulos (dineína, MAP4, MAP1B, tau), proteínas implicadas en la replicación (MCM2, MCM4, ribonucleótido reductasa R2), traducción y proteólisis dependiente de ubiquitinación (ver más adelante) y otras proteínas involucradas en la progresión y salida de la mitosis (Arendt, 2008).

La precisión de la expresión temporal de las proteínas reguladoras del ciclo celular también depende de la maquinaria proteasomal y sus proteínas asociadas. Dos complejos ubiquitina ligasa son responsables del control de la degradación de las proteínas durante el ciclo celular: la familia de ubiquitina ligasas SCF y el complejo/ciclosoma promovido por anafase (APC/C, por sus siglas en inglés), este último se ha demostrado que está involucrado en funciones de memoria y aprendizaje (Hernández et al., 2011).

Finalmente, se requiere la inactivación de los complejos Cdk1/Ciclina B para la adecuada salida de la mitosis. Esta inactivación es completada por la degradación de ciclinas tipo B vía ubiquitinación mediante la vía proteolítica regulada por el APC/C (Malumbres y Barbacci, 2005). Esto reinicia el sistema y reestablece el requerimiento para las señales mitogénicas que inducen ciclinas tipo D para el siguiente ciclo (Arendt, 2008) (**Fig 14**).

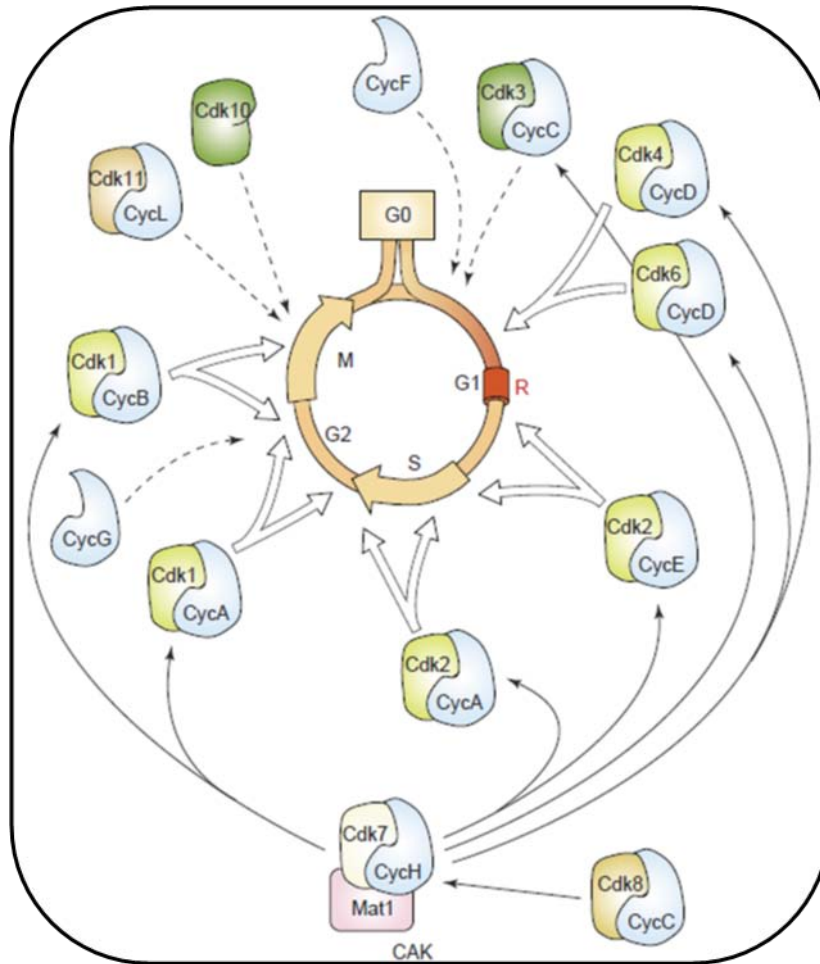


Fig. 14. Papel propuesto de los complejos Cdk/Ciclina en el ciclo celular de mamíferos. Cdk10 y Cdk11 podrían estar involucrados en la mitosis pero su relevancia funcional no está bien conocida. La ciclina F podría ser requerida para entrar a la fase G1 y la Ciclina G está implicada en la respuesta al daño del ADN durante la transición G2/M. Las funciones de Cdk3, Cdk10, Cdk11, Ciclina F y Ciclina G están representadas por flechas

punteadas para indicar que los datos que las implican en el ciclo celular aún son preliminares. Tomado de Malumbres y Barbacid 2005.

ROL BIOLÓGICO DE OTRAS CDK's

Cdk5 (también conocida como Kinasa Neuronal tipo C2CD (NCLK, por sus siglas en inglés) es el único miembro de la familia que no participa en la regulación de la progresión del ciclo celular sino que actúa como una cinasa reguladora involucrada en otros procesos post-mitóticos (Smith et al, 2001). Sin embargo, se ha demostrado que aunque Cdk5 no conduce a la progresión del ciclo celular, esta proteína sí influencia la detención de éste. Como una consecuencia, la pérdida de Cdk5 conduce a fallas en la supresión del ciclo celular y subsecuente muerte neuronal (Zhang et al., 2010).

El papel principal conocido para Cdk5 está en la regulación de la citoarquitectura del SNC pero también hay evidencia que liga a la actividad de Cdk5 con la regulación del citoesqueleto, orientación axonal, transporte de membrana, función sináptica, señalización de DA y adicción a drogas (Dhavan y Tsai, 2001; Smith, 2001; Harper y Adams, 2001).

Además, se ha demostrado que la expresión de Cdk5 en el sistema colinérgico septohipocampal, es necesario para el proceso de consolidación de la memoria (Fischer et al, 2002).

En su forma monomérica Cdk5 no muestra actividad enzimática, es activada por p35 (NCK5a, siglas en inglés para activador neuronal de Cdk5) y p39 (NCK5ai, siglas en inglés para isoforma del activador de Cdk5) dos proteínas que son expresadas casi únicamente en el cerebro (Malumbres y Barbacid, 2005; Wang et al, 2005), particularmente en neuronas postmitóticas (Dhavan y Tsai, 2001; Cruz et al, 2003) con niveles elevados en el CBA (Nikolic, 1996)

y se ha encontrado también en el músculo en desarrollo (Smith, 2001). En el cerebro en desarrollo, p35 se excluye de la zona ventricular y por lo tanto de las células en proliferación. En contraste niveles elevados de Cdk1, Cdk2, Cdk4 y Cdk6 acompañados por sus subunidades reguladoras son evidentes en la zona ventricular (Nikolic, 1996). De manera interesante, a pesar de su rol regulador de Cdk5, p35 no exhibe homología con ninguna ciclina conocida y no activa otros miembros de la familia de Cdk's (Nikolic et al, 1996).

Cdk5 también se une a ciclinas tipo D y tipo E aunque los complejos heterodiméricos no tienen actividad cinasa (Malumbres y Barbacid, 2005). Además se ha demostrado que se une y fosforila a pRb in vitro sin que se haya mostrado nunca su participación en la regulación del ciclo celular (Weishaupt et al, 2003).

A pesar de que p35 y p39 tienen secuencia mínimamente similar a la de las ciclinas, el modelado computacional y estudios de mutagénesis han previsto que p35 podría adoptar estructura terciaria tipo ciclina (Dhavan y Tsai, 2001). Reciente cristalización de un complejo entre Cdk5 y p25 (un residuo carboxilo terminal, producto proteolítico de p35) ha confirmado estas predicciones, mostrando que p25 se pliega en una conformación muy similar a la de la caja ciclina (Dhavan y Tsai, 2001).

Estudios bioquímicos previos han demostrado que la fosforilación del equivalente al residuo Thr160 del resto de las ciclinas, Ser 159 no es requerida para la activación máxima de Cdk5. Aunque Thr14 y Tyr15 están conservados en Cdk5, ésta no se fosforila por Wee1 in vitro. Tyr 15 en Cdk5 puede fosforilarse mediante c-Abelson (c-Abl) cuya asociación a Cdk5 es reforzada por una proteína adaptadora: Cables (Dhavan y Tsai, 2001).

La naturaleza inestable de la proteína p35 subraya la importancia de los niveles de expresión reguladores de p35. Algunas integrinas como laminina y la glicoproteína de la matriz extracelular pueden inducir la síntesis del RNAm de p35 así como la actividad cinasa de Cdk5, sin embargo, el mecanismo por el cual se lleva cabo dicha inducción se mantiene desconocido (Dhavan y Tsai, 2001).

Recientemente se ha demostrado que el factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés) induce la expresión de p35 en células PC12. Al parecer, la cascada de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) se requiere para dicha inducción, así como la inhibición farmacológica de la vía ERK bloquea este efecto, la activación constitutiva de la vía ERK es suficiente para la inducción de p35. El factor de respuesta a crecimiento temprano 1 (EGR1, por sus siglas en inglés), un miembro de la familia de factores de transcripción con dedos de Zinc inducido por NGF, puede unirse a la región promotora de p35. Así, la regulación a la alta de p35 inducida por NGF podría estar mediada por EGR1 (Dhavan y Tsai 2001). El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) también puede inducir la actividad cinasa de Cdk5 en cultivos de neuronas primarias (Dhavan y Tsai, 2001).

Estudios de inmunohistoquímica han demostrado que la señal de p35 es intensa en la periferia de la célula. Hay un residuo de miristoilación en el extremo aminoterminal en p35 y p39 que orienta estas proteínas hacia la membrana celular (Dhavan y Tsai, 2001, Cruz y Tsai, 2004). Cuando Ck5 se sobre-expresa no muestra una distribución específica pero llega a estar localizada en la periferia de la célula cuando co-expresa con p35. Por lo tanto, la distribución sub-celular de Cdk5 está determinada por p35 y p39. Además, los sustratos fisiológicos de Cdk5 probablemente son transmembranales o proteínas asociadas a membrana (Dhavan y Tsai, 2001).

P35 es una proteína inestable con un tiempo de vida media de 20-30min y es degradada por ubiquitinación (Dhavan y Tsai, 2001, Cruz y Tsai, 2004). La inhibición de la actividad cinasa de Cdk5 incrementa la estabilidad de p35 varias veces, esta observación contribuye con la posibilidad de una retroalimentación de Cdk5/p35 y muestra que la actividad cinasa de Cdk5 está estrechamente regulada en las neuronas (Dhavan y Tsai, 2001).

Los complejos Cdk5/p35 y Cdk5/p39 fosforilan numerosos sustratos involucrados en varios aspectos de la transcripción (mSds3, Stat3, p53), función neuronal (tirosina hidroxilasa, Nudel, Amfifisina 1, Munc18a), migración (doublecortin, disabled1), adhesión celular (β -catenina, Src.), regulación de la localización de APP (β -APP), transmisión sináptica (sinapsina1, PSD-95) (Malumbres y Barbacid, 2005), regulación de la estabilidad de microtúbulos (Tau, MAP1B, PAK1, NFH/NFM), regulación de la señalización dopaminérgica (DARPP32), regulación de la señalización en la unión neuromuscular (ERBB), diferenciación y apoptosis neuronal (Dhavan y Tsai, 2001) (**Fig 15**).

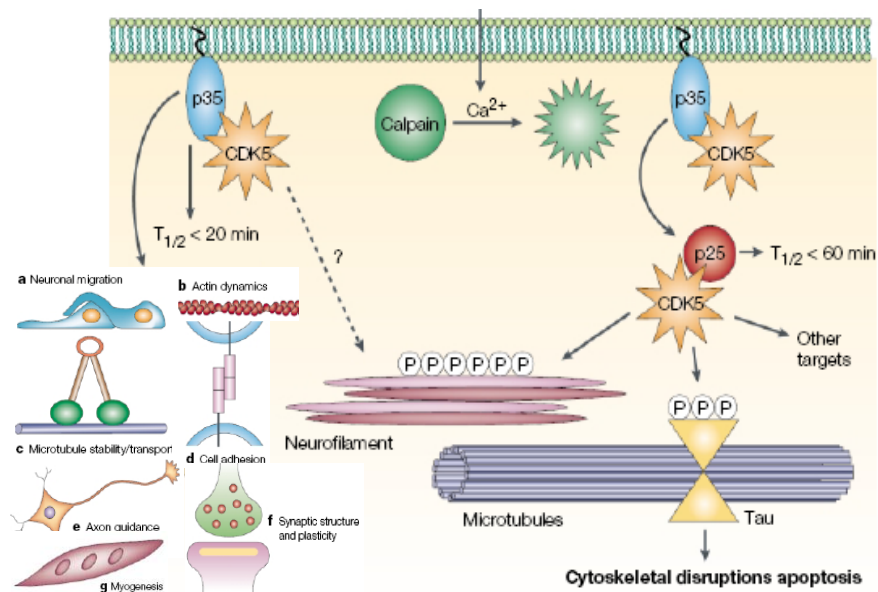


Fig. 15. Sustratos conocidos de Cdk5/p35 y Cdk5/p25. Modificado de Cruz et al, 2003.

Experimentos genéticos han demostrado un papel esencial de Cdk5 en la citoarquitectura del SNC. Los ratones deficientes de Cdk5 mueren después del nacimiento y muestran varias alteraciones en las capas neuronales de muchas estructuras cerebrales incluyendo la corteza cerebral, hipocampo, cerebelo y bulbo olfatorio indicando un posible daño en la migración neuronal. (Dhavan y Tsai, 2001). En contraste a los mutantes que carecen de Cdk5, los ratones carentes de p35 son viables y fértiles aunque susceptibles a las convulsiones y también tienen defectos en la fasciculación de diferentes tractos axonales (Dhavan y Tsai, 2001).

Recientemente se ha demostrado que Cdk5 modula la señalización de DA en neuronas dopaminérgicas vía fosforilación de una proteína específica del neostriado DARPP32 (Dhavan y Tsai, 2001; Weishaupt, 2003). La administración crónica de cocaína a las ratas incrementa la expresión de p35 y Cdk5. El incremento de la expresión de Cdk5 y p35 en este caso se acompaña por un incremento de la fosforilación de DARPP32 en Thr75 y disminuye la fosforilación de proteínas blanco para la fosfocinasa A (PKA, por sus siglas en inglés) (Dhavan y Tsai, 2001). Las drogas de abuso, tales como la cocaína, alcanzan algunas de sus acciones por modificación a la alta de la señalización de los receptores de dopamina. Por otro lado, se ha visto un incremento sostenido en los niveles del factor de transcripción FosB después de la administración crónica de cocaína y el RNAm así como la proteína de Cdk5 se encuentran elevados en el hipocampo y el estriado de los ratones transgénicos que expresan FosB. La administración repetida de descargas electroconvulsivas, un tratamiento que induce la expresión de FosB, también incrementa la expresión de Cdk5. En adición, la sobreexpresión de FosB en las células induce la expresión del promotor de Cdk5, indicando que Cdk5 podría ser uno de los blancos mediante el cual FosB

media algunos de sus efectos fisiológicos a largo plazo en el cerebro (Dhavan y Tsai, 2001).

Cdk5 también se asocia con los microtúbulos del citoesqueleto. Muchas proteínas asociadas a microtúbulos (MAP's), incluyendo MAP1B y Tau son sustratos de Cdk5 (Dhavan y Tsai, 2001; Cruz, et al, 2003). La fosforilación de Tau por Cdk5 reduce su unión a microtúbulos e inhibe su habilidad para promover el ensamble así como la actividad de nucleación de éstos (Dhavan y Tsai, 2001).

Se ha observado la actividad incrementada de Cdk5 en diversas enfermedades neurodegenerativas incluyendo la EA (Smith et al , 2001; Fisher, 2002; Cruz et al , 2003) caracterizada por la hiperfosforilación de proteínas del citoesqueleto y disminución de la transmisión colinérgica,, conduciendo ademenia (Fisher, 2002) y en modelos animales con esclerosis amiotrófica lateral (EAL) y enfermedad de Niemann Pick tipo C (NPC) (Cruz et al, 2003) enfermedad de Parkinson y demencia frontoparietal (FTD, por sus siglas en inglés) (Arendt, 2008). En todos estos casos, la actividad de Cdk5 se acompaña de un incremento en la acumulación de la forma truncada de p35, p25 (Cruz et al, 2003).

DESREGULACIÓN DE CDK5.

Bajo ciertas condiciones, la actividad de Cdk5 se desregula. El daño oxidativo o la isquemia, el tratamiento con A β 42 u otros agentes neurotóxicos elevan los niveles de calcio intracelular en neuronas y activan la cisteína proteasa calpaína. Cuando la calpaína se activa, escinde a p35 formando un fragmento p10 amino terminal y un fragmento p25 carboxilo terminal (Mapelli y Musacchio 2003; Cruz y Tsai, 2004) **Fig.16**. Dicha escisión también es regulada por la fosforilación de p35. El activador truncado p25 contiene todos

los elementos necesarios para unirse y activar a Cdk5 (Cruz y Tsai, 2004). Un segmento equivalente p29 se genera bajo condiciones similares a partir de p39 y también mantiene la capacidad de interactuar con Cdk5 (Mapelli y Musacchio 2003).

Sin embargo, la secuencia de miristoilación en p35 no está presente en p25 (Cruz y Tsai, 2004) ni en p29 (Mapelli y Musacchio 2003) y esto cambia la localización subcelular del complejo Cdk5/p25 y Cdk5/p29 respecto al complejo Cdk5/p35 y Cdk5/p39 (Mapelli y Musacchio 2003; Cruz y Tsai, 2004). Adicionalmente, Cdk5/p25 es más estable que Cdk5/p35 debido a que el tiempo de vida media de p25 es 5 veces mayor a la de p35. Por lo tanto, en unión a Cdk5, p25 causa alteración en la localización y activación prolongada de Cdk5 (Cruz y Tsai, 2004) por lo que su acumulación en complejo con Cdk5 es muy tóxica para las neuronas (Mapelli y Musacchio 2003).

La sobreexpresión de p25 en cultivos e neuronas corticales resulta en la alteración del citoesqueleto, hiperfosforilación de Tau (Hashiguchi et al, 2002; Cruz et al, 2003) en ciertas áreas cerebrales simulando la EA (Zheng et al, 2005) y muerte celular por apoptosis, indicando que la activación aberrante de Cdk5 es neurotóxica (Cruz et al, 2003; Zheng et al, 2005).

La hiperfosforilación anormal de Tau después del tratamiento con β Amiloide₁₋₄₂ (β A) desestabiliza los microtúbulos, contribuyendo a la degeneración neuronal y la formación de PHFs contenidos en los NFTs. La inhibición farmacológica de Cdk5 (Cruz et al, 2003; Zheng et al, 2005) y de la calpaína (Zheng et al, 2005) también atenúa la neurotoxicidad resultante del tratamiento con el péptido β A (Cruz et al, 2003; Zheng et al, 2005) y estabilizan a p35 (Zheng et al, 2005). En adición, la conversión de p35 a p25 puede estar inducida por el tratamiento con β A. Estas observaciones en conjunto con los hallazgos de que en ratones transgénicos mutantes de APP,

β A induce la fosforilación de Tau dependiente de Cdk5 que se acompaña de la acumulación de p25, sugiriendo que Cdk5/p25 puede mediar el efecto neurotóxico de β A sobre la fosforilación de Tau (Cruz et al., 2003).

El complejo Cdk5/p25 puede fosforilar mucho más rápido (hasta 2.4 veces más) e incorporar más moles de fosfato a la proteína Tau que el complejo Cdk5/p35 (Hashiguchi, 2002).

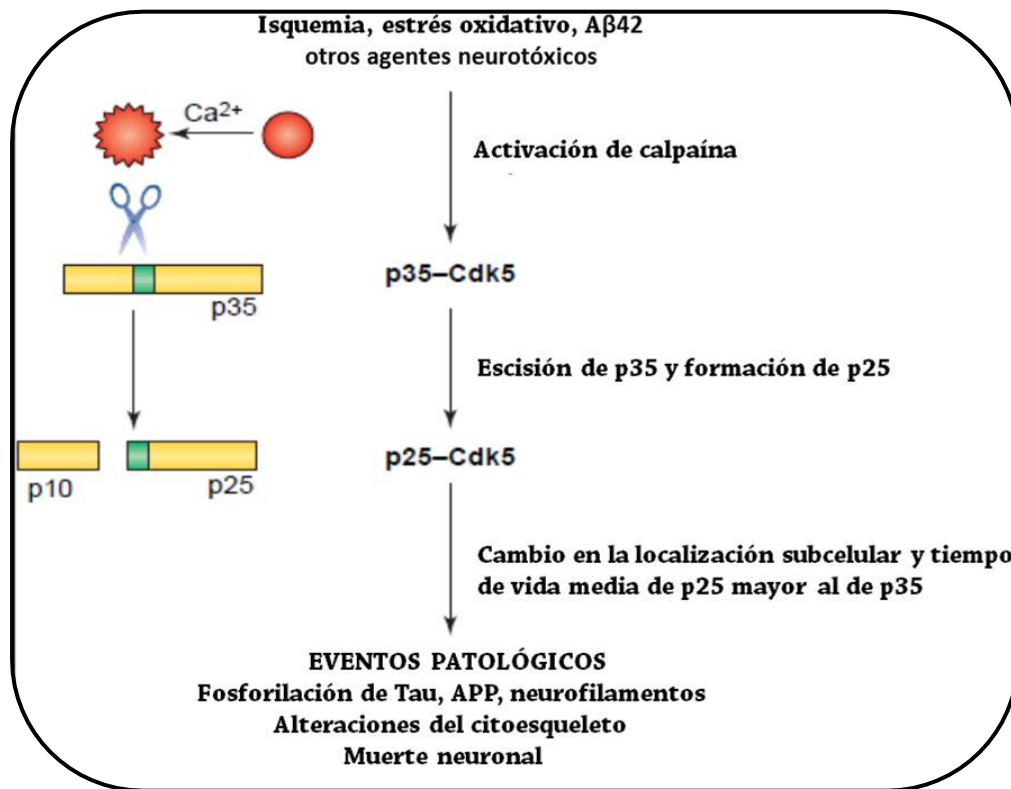


Fig 16. La desregulación de Cdk5 en la patogénesis. Ver texto para la descripción. Modificada de Cruz y Tsai, 2004.

REACTIVACIÓN DEL CICLO CELULA EN NEURONAS MADURAS.

Las neuronas quiescentes residen en la fase G0 hasta que señales mitogénicas activan la maquinaria del ciclo celular. Actualmente se acepta que en neuronas maduras, se requiere de muchas vías de señalización, programas de transcripción y una orquestación elaborada de salida del ciclo celular para una variedad de funciones cerebrales (Hernández et al, 2011).

Como las células maduras no se dividen, la activación de un ciclo celular neuronal parece ser abortivo en muchos casos desencadenando finalmente la disfunción neuronal o apoptosis (Hernández et al, 2011). Numerosos estudios han provisto evidencia de que los mecanismos asociados al ciclo celular contribuyen con la muerte neuronal en diferentes condiciones patológicas, incluyendo el daño del ADN, excitotoxicidad y exposición ~~βA~~ (Hernández et al, 2011). Además, se ha implicado la reentrada aberrante al ciclo celular en la muerte neuronal durante infarto, trauma, epilepsia, EAL, Parkinson y EA (Hernández et al 2011). Las proteínas asociadas al ciclo celular se expresan en neuronas expuestas a daño irreversible del ADN, implicando una relación entre la maquinaria del ciclo celular y los procesos de reparación del ADN en neuronas postmitóticas. En otras palabras, la reentrada al ciclo celular representa la necesidad de descansar las células para activar los mecanismos de reparación del ADN (Hernández et al, 2011).

Aunque en la mayoría de los casos, la reactivación del ciclo celular en neuronas maduras conduce a apoptosis, recientemente se han revelado neuronas diferenciadas capaces de mantener la división celular mientras mantienen las características de neuronas maduras incluyendo los contactos sinápticos (Hernández et al, 2011).

Otra hipótesis concerniente a un rol alternativo de la maquinaria del ciclo celular, liga la expresión de las proteínas del ciclo celular con la plasticidad cerebral. La expresión de proteínas relacionadas con el ciclo celular en neuronas terminalmente diferenciadas se ha asociado con funciones fisiológicas más allá del ciclo celular, particularmente en los mecanismos de neuroplasticidad basados en el control de microtúbulos. Recientemente se ha demostrado que las ciclinas D, E, A y B así como las Cdk's 1, 2, 4 exhiben actividad cinasa hacia la proteína asociada a microtúbulos (MAP, por sus siglas en inglés) Tau. Estos hallazgos sugieren que la presencia de los complejos Cdk/ciclina en neuronas maduras puede reflejar su papel en la estabilización y regulación de la dinámica del citoesqueleto durante la adaptación morfogénica y que Tau, en adición, puede actuar como un blanco de fosforilación importante. (Hernández et al, 2011).

La asociación entre un estímulo apoptótico y la reactivación de la maquinaria del ciclo celular en neuronas maduras se mantiene en estudio pero la activación de Cdk4 parece ser esencial para la muerte neuronal. Por otro lado, Cdk5 citoplásmica parece retardar la muerte neuronal mediante un mecanismo que involucra probablemente proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (Hernández, 2011). Cdk5 se localiza normalmente en el núcleo y citoplasma y puede actuar de dos formas dependiendo de su localización dentro de la neurona: en el núcleo suprime el ciclo celular y en el citoplasma retarda transitoriamente la muerte celular. Se ha demostrado que las neuronas que han re-entrado al ciclo celular pierden su Cdk5 nuclear mientras que conservan la que se localiza en citoplasma (Zhang et al, 2010).

La implicación de la reactivación del ciclo celular en la EA se obtuvo inicialmente del análisis del tejido cerebral de pacientes con EA, los cuales mostraron la expresión y activación de la Ciclina B y Cdc2 (Cdk1) en neuronas diferenciadas. Se ha propuesto que Cdc2 contribuye a la formación

de placas amiloides y ovillos neurofibrilares. El complejo Cdc2/Ciclina B puede fosforilar a la proteína Tau, además se sabe que la proteína precursora de amiloide (APP) se fosforila in vitro por Cdc2, favoreciendo la producción de fragmentos amiloides. Estos datos proporcionan un fuerte soporte para inculcar la reactivación del ciclo celular y los dos principales marcadores histoatólogicos de la EA (Hernández et al, 2011).

RELACIÓN DE LAS CDK'S Y CICLINAS CON LAS HORMONAS OVÁRICAS.

Se considera que los efectos hormonales sobre la proliferación celular en asociación con la modulación de la actividad de ciclinas y los CKIs ocurren a diferentes niveles. Esto es, la presencia de ciclinas y CKIs puede estar regulada directamente por las hormonas. Las hormonas pueden también alterar directamente la distribución subcelular de las ciclinas/Cdks o cambiar la composición de las subunidades de los complejos ciclina/Cdk y así alterar su actividad sobre el sustrato (Pestel, 1999).

Los Estrógenos estimulan la progresión del ciclo celular en la fase temprana G1 en cultivos de células epiteliales de mama. La expresión de la Ciclina D1 se reduce mediante el tratamiento antiestrogénico en células T47D (Pestel, 1999). El tratamiento con E resulta en la formación de complejos de alto peso molecular de Cdk2 y Ciclina E, el cual carece de p21 y p27, ambos, inhibidores de dicho complejo. En este complejo se encuentra incrementada la fosforilación de CDk2 an el residuo Thr 160. En parte, la activación de Cdk2/Ciclina E parece involucrar la reducción de la asociación de Iso Cdkl's y un incremento de la actividad de CAK. La naturaleza de este complejo de alto peso molecular es actualmente desconocida, sin embargo, es posible que estos complejos incluyan proteína coactivadoras de RE, tales como SRC o p300 (Pestel, 1999).

La administración de E₂ a ratas adultas ovariectomizadas induce dentro de las primeras 25hrs la activación significativa de Cdk 4, 5 y 6 pero no de Cdk2 en el útero, acompañado por un incremento en la expresión del RNAm de las ciclinas D1 , D3, A y E en tejido de útero. Además, la expresión del inhibidor p27 también es inducido por E₂ en este órgano (Altucci et al, 1997).

Diferentes receptores nucleares son fosforilados y activados por ciclinas/Cdks, incluyendo los receptores de glucocorticoides y de estrógenos. La sobreexpresión del complejo Cdk2/ciclina A eleva la actividad de los receptores para P₄ (Narayanan, 2005; Moore, 2007) y también se ha observado que la sobre-expresión de la Ciclina A incrementa la actividad de los RE's y que el RE es fosforilado entre los aminoácidos 82 y 121 por la ciclina A in vitro, un efecto que es inhibido por la sobre-expresión de p27 (Pestel, 1999).

En líneas celulares de cáncer de mama, las progestinas estimulan e inhiben la progresión del ciclo celular. La respuesta inicial es la aceleración de las células de G1 a S y después, antes de completar el ciclo celular, las células tratadas con progestinas son arrestadas en fase G1. La inducción transitoria de la fase G1 por las progestinas se acompaña de la inducción de la Ciclina D1. La reducción en la actividad de Cdk1 que ocurre con el tratamiento con antiprogestinas, tales como RU486 u ORG31710 se asocia con la inducción del RNAm de p21 (Pestel, 1999).

TAU: IMPLICACIONES EN LA NEURODEGENERACIÓN.

Las neuronas son células con morfología compleja que desarrollan dos tipos de extensiones citoplasmáticas, axones y dendritas. La transmisión neural ocurre a través de estos procesos y además, algunos cambios en la morfología neuronal pueden afectar su conducta y producir eventos

patológicos. Debemos mantener en mente que la diferenciación morfológica de una neurona involucra un gran arreglo del citoesqueleto, el cual es responsable de mantener la forma de la célula. El citoesqueleto tiene tres componentes principales: los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios. Los microtúbulos son estructuras muy dinámicas y en células proliferantes como los neuroblastos, la probabilidad de ensamblaje es la misma que la de desensamblaje en todas las direcciones.

Se ha sugerido que algunas proteínas específicas pueden servir para estabilizar los microtúbulos y tales proteínas incluyen las proteínas asociadas a microtúbulos o MAPs (por sus siglas en inglés) tales como MAP1A, MAP1B, MAP2 y Tau. Existe una distribución asimétrica de las MAPs en neuronas maduras, Tau se localiza principalmente en axones por lo que su función/disfunción ya sea sola o en sinergismo con otras MAPs se ha asociado con la función de microtúbulos axonales. Además, en condiciones patológicas, Tau ha sido capaz de mostrar polímeros fibrilares aberrantes.

EL GEN HUMANO DE TAU.

El gen humano de Tau está localizado en el cromosoma 17 donde ocupa cerca de 100kb y contiene al menos 16 exones. Tau se expresa principalmente en neuronas y se ha propuesto que interactúa con factores neurales específicos. No obstante, la expresión neural específica podría deberse también a la presencia de posibles elementos silenciadores en células no neurales.

El gen de tau se transcribe en RNA nuclear que, por "splicing" alternativo, produce diferentes especies de RNAm. La traducción de estas diferentes especies resulta en la producción de diferentes isoformas de Tau.

En el sistema nervioso periférico (SNP), se expresa una isoforma de alto peso molecular que expresa el exón 4A, el cual produce una proteína conocida como Tau grande con peso aproximado de 100kDa. En el SNC, el

“splicing” alternativo de los exones 2, 3 y 10 resulta en la aparición de seis isoformas.

Tau es una proteína hidrofílica cuyas isoformas se han subdividido en dos grandes dominios: el dominio de proyección que contiene las terceras partes de la molécula en el extremo amino y el dominio de unión a microtúbulos que abarca una tercera parte de la molécula en el extremo carboxilo terminal.

Se han propuesto diferentes roles para el dominio de proyección incluyendo el de la determinación del “splicing” entre microtúbulos axonales, interacción con otras proteínas del citoesqueleto o unión a cationes debido a la presencia de residuos ácidos, unión a heparina, interacción con proteínas que contienen dominios SH3. Como resultado, esta región puede jugar un papel en la unión de Tau a proteínas asociadas a la membrana plasmática.

El dominio de unión a microtúbulos contiene tres (tau3R) o cuatro (tau4R) secuencias repetitivas similares pero no idénticas de 31 o 32 residuos. El “splicing” alternativo del exón 10 puede resultar en la expresión de tau3R o tau 4R en una célula, lo cual puede producir algunas diferencias fisiológicas. Por ejemplo, tau 4R se une a los microtúbulos con gran afinidad y puede desplazar a la tau 3R previamente unida al microtúbulo.

Se ha reportado que Tau se une a los microtúbulos de dos maneras: cuando la unión se realiza sobre microtúbulos previamente ensamblados y cerrados, tau se une por fuera de la superficie; sin embargo, cuando Tau se mezcla con la Tubulina y después se ensambla, Tau se une por dentro de los microtúbulos.

Se han descrito diferentes modificaciones post-traduccionales para la proteína Tau, incluyendo fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, desaminación, oxidación, nitración, “cross linking” o glicación. La más estudiada de éstas ha sido la fosforilación.

Diversos estudios han sugerido que las serina/treonina cinasas dirigidas a prolina, junto con proteínas fosfatasa juegan un papel importante en la hiperfosforilación de Tau (Hashiguchi et al, 2002). Hay 79 sitios putativos de fosforilación de serina o treonina en la isoforma más grande de Tau en el SNC, la cual contiene 441 residuos. Hay aún más en la isoforma del SNP pero su fosforilación no ha sido completamente estudiada (Ávila et al, 2004). Dichos sitios se han dividido en dos grupos principales: aquellos que pueden ser modificados por las cinasas dirigidas a prolina como la proteína cinasa tau I (cinasa glicógeno sintasa 3 o GSK, por sus siglas en inglés), proteína cinasa II (Cdk5), MAPK (p38) (Hashiguchi et al, 2002; Ávila et al, 2004), JNK y otras cinasas de estrés o cdc2; el otro grupo incluye aquellas que podrían ser modificadas por cinasas no dirigidas a prolina como la proteína cinasa A, proteína cinasa C (PKA, PKC, respectivamente por sus siglas en inglés), calmodulina (CaM), cinasa II, MARK cinasas o CKII que modifican residuos cercanos a residuos ácidos, principalmente en exones 2 y 3 (Ávila et al, 2004). Ninguna de estas enzimas puede por sí sola generar PHF-Tau (Hashiguchi et al, 2002).

La fosforilación parece ser la forma predominante en la cual se puede regular la función de Tau así como su localización subcelular. Por ejemplo, en células neurales, Tau se puede asociar con la membrana plasmática o con microtúbulos en una interacción que podría estar modulada por la fosforilación. Las isoformas de Tau que son fosforiladas en sus regiones ricas en prolina están presentes principalmente en el compartimiento somatodendrítico mientras que aquellas isoformas donde las mismas regiones se encuentran desfosforiladas así como aquellas fosforiladas en su dominio carboxilo terminal tienden a encontrarse en la región distal del axón. Cabe mencionar que Tau es principalmente una proteína neuronal aunque se ha demostrado su presencia en diferentes tipos de células gliales en algunos estados patológicos (Ávila et al, 2004).

Como mencionamos anteriormente, diferentes cinasas pueden modificar a Tau (Ávila et al, 2004). La fosforilación aberrante de esta proteína se considera que participa de manera decisiva en la patogénesis de los desórdenes neurodegenerativos colectivamente llamados taupatías (Hashiguchi, 2002). Existe evidencia de que GSK3 tiene un papel importante en la regulación de la proteína bajo condiciones fisiológicas o patológicas. Esta cinasa puede fosforilar a nivel de la treonina 231 y afectar la unión a microtúbulos o a nivel de la serina 396 o 404 donde no parece afectar la unión a microtúbulos.

FOSFORILACIÓN DE TAU POR CDK5

Cdk5 fosforila varios epítomos de Tau in vitro que también son hiperfosforilado en cerebros con EA y se cree que tienen un papel en la formación de ovillos neurofibrilares (NFTs, por sus siglas en inglés) (Cruz, et al, 2003), uno de los principales marcadores de la EA (Zheng et al, 2005). Se ha demostrado que dichos epítomos también se fosforilan in vivo por p25 mediante estudios con ratones transgénicos p25, dichos sitios de fosforilación incluyen los residuos Ser202, Thr205, Ser396, Ser178, Ser199, Thr217, Ser 235, Ser198, Ser239, Ser400 y Thr403 lo cual sugiere que su fosforilación puede estar regulada por el complejo Cdk5/p25. La fosforilación de dichos epítomos también se encuentra en la formación de filamentos helicoidales apareados (PHFs, por sus siglas en inglés) (Cruz et al, 2003). También se ha demostrado que Cdk5 modula la actividad de otras cinasas involucradas en la fosforilación de Tau tales como las p42/44 MAPK y FAK, que se han involucrado en la progresión de la fosforilación de Tau en la EA (Cruz, et al 2003) mientras que no se ha encontrado actividad de p25 sobre GSK3 β , otra cinasa íntimamente involucrada en la fosforilación de Tau lo que sugiere que CDk5 y GSK3 β actuar en vías separadas que conducen a la hiperfosforilación de Tau o la formación de NFTs (Cruz et al , 2003).

Se ha determinado que muchos de los epítomos patológicos hiperfosforilados en los cerebros de pacientes con EA se generan por fosforilación secuencial de diferentes Tau cinasas. Por ejemplo, la fosforilación de un residuo específico mediante Cdk5 es un pre-requisito para la acción subsecuente por GSK3 β . Se sabe que la fosforilación de Thr212 mediante GSK3 β facilita la acción de la PKA sobre el residuo Ser214 (Hashiguchi et al, 2002).

Se ha propuesto que la fosforilación de los diferentes residuos de Tau por el complejo Cdk5/p25 se lleva a cabo de manera secuencial, siendo primero la fosforilación de Ser202 y posteriormente Thr205 mientras que el complejo Cdk5/p35 tiene efecto débil o nulo sobre Thr205 (Hashiguchi 2002).

Por otro lado, muchas fosatasas del tipo de la proteína fosfatasa (PP): PP1, PP2A, PP2B (calcineurina) y PP2C se han implicado en la reversión de la fosforilación de Tau. Sin embargo, solo PP1, PP2A y PP2B han demostrado que pueden desfosforilar a la proteína Tau anormalmente hiperfosforilada.

El estado fosforilado de Tau es diferente durante el desarrollo siendo alto en las neuronas fetales y va disminuyendo con la edad. Además, un incremento importante en la fosforilación se produce en situaciones patológicas conocida como Taupatías.

Cdk5, conocida inicialmente como una proteína cinasa neuronal o dirigida a prolina o proteína cinasa tipo cdc2 fosforila a Tau con alta estequiometría. A diferencia de otras Tau cinasas, la actividad de Cdk5 se regula por proteínas endógenas: p35 y p39 (Hashiguchi, 2002).

Recientemente se ha encontrado que la calpaína una proteasa dependiente de calcio escinde a p35 y p39 y forma sus productos truncados: p25 y p29, respectivamente. Además, el corte de p35 a p25 y la formación subsecuente

del complejo p25/Cdk5 resulta en daño neuronal y la hiperfosforilación de Tau (Hashiguchi, 2002).

Muchos de los epítomos patológicos en Tau hiperfosforilada en los cerebros de los pacientes con EA se generan por fosforilación secuencial mediante Tau cinasas diferentes. Por ejemplo, la fosforilación de un aminoácido específico mediante Cdk5 es un pre-requisito para la acción cinasa subsecuente de GSK3 β .

Estudios donde se ha estudiado la cinética de fosforilación de Tau se ha sugerido que su fosforilación general depende de la cinética de los residuos de Serina 202 (Ser₂₀₂), Serina 235 (Ser₂₃₅) y Serina 404 (Ser₄₀₄).

Se ha demostrado que existe una fosforilación secuencial por diferentes complejos de cinasas, por ejemplo la fosforilación del residuo de Treonina 205 (Thr₂₀₅) por Cdk5/p25 ocurre solo después de que (Ser₂₀₂) se ha fosforilado. En adición, el complejo Cdk5/p35 tiene ligera o nula acción cinasa sobre Thr₂₀₅. Esto sugiere que la escisión de p35 a p25 regula no solo la actividad cinasa general de Cdk5 sino además la fosforilación secuencial de Ser₂₀₂ y Thr₂₀₅ (Hashiguchi et al, 2002).

El estado de fosforilación de Tau es importante, debido a que una hiperfosforilación aberrante (más de nueve grupos fosfato asociados a la proteína) de Tau perturba su estructura y función aumentando la resistencia a la proteólisis y afectando el transporte axonal. Esto ocurre cuando se rompe el equilibrio entre cinasas y fosfatasas.

La desfosforilación depende de la acción de fosfatasas. Sin embargo, sólo la PPA, PP2A, PP2B y P5 han demostrado mantener la habilidad para desfosforilar la Tau hiperfosforilada. La PP2A es considerada la principal fosfatasa, la cual contribuye con el 70% de la actividad. Así, es predecible que una reducción de la actividad de PP2A podría conducir a la formación de

proteínas Tau hiperfosforiladas, no sólo debido a la insuficiencia de la desfosforilación sino también a la activación de cinasas reguladas por PP2A tales como PKA, CaMII y MAPK. La cantidad de la proteína Tau es el resultado del equilibrio entre la síntesis y degradación. La degradación de Tau puede ser completada vía complejo proteasoma o vía calpaína. La fosforilación de Tau conduce a la reducción de la proteólisis vía calpaína mientras que podría ser mantenida por el proteasoma 20S (Magdalinni, 2008).

La pérdida de la capacidad de unión de la proteína Tau a microtúbulos causa la desestabilización del citoesqueleto microtubular con la consiguiente afectación de otros organelos citoplasmáticos como mitocondrias y lisosomas (Alonso AD et al, 1997). Esto promueve una patología adicional de Tau por formación de filamentos helicoidales apareados que generan las marañas neurofibrilares (Braak y Braak., 1991). Las patologías que presentan marañas neurofibrilares como característica morfológica principal reciben el nombre de Taupatías (Lee et al, 2005).

Algunos ejemplos de estas patologías son la EA, Enfermedad de Pick y otras demencias como la Frontotemporal (DFT) y la Frontotemporal con amiotrofia. También han sido descritas marañas neurofibrilares en pacientes con síndrome de Down, en pacientes con la enfermedad de Parkinson que presentan demencia (Buée et al, 2000) así como en los pacientes que padecen la Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP) y en Degeneración Cortico-basal-gangliónica (DCBG).

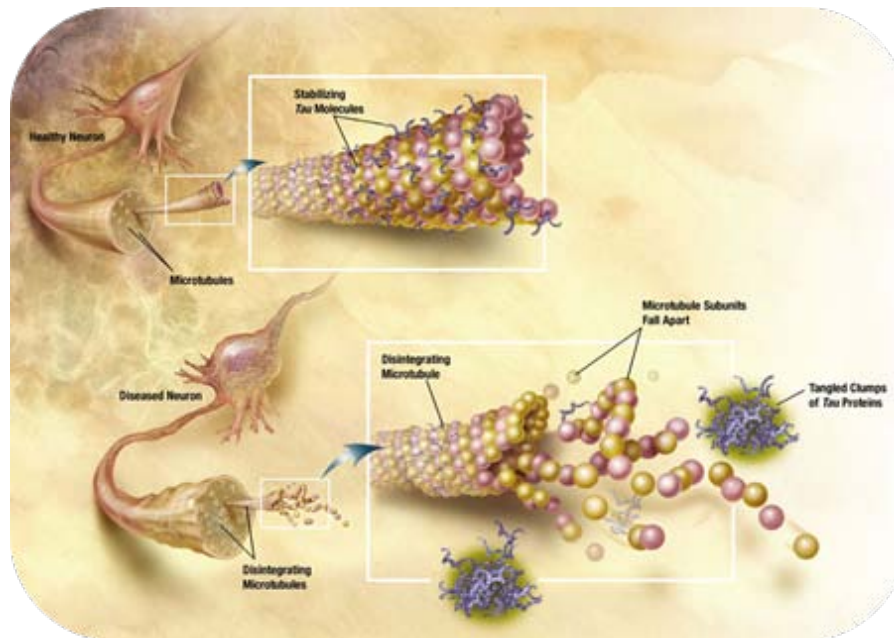


Fig. 17. Proteína asociada a microtúbulos Tau. En neuronas sanas la proteína Tau estabiliza los microtubulos manteniendo la citoarquitectura de la célula. Tau es modificada químicamente en personas con EA lo cual induce su acumulación en PHFs lo cual contribuye a la formación de NFTs que conduce a la desintegración de los microtubulos y otros mecanismos que terminan en la muerte neuronal. Tomado de Chemical biology news from across RSC Publishing, 2009.

EFFECTO DE LAS HORMONAS ESTEROIDES SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU.

Las hormonas gonadales promueven el crecimiento y plasticidad neuronal (García-Segura y cols., 1994; Parducz y cols., 2006) y la regulación de la expresión de la fosforilación de Tau (Guerra Araiza et al., 2007).

En estudios realizados *in vitro* se ha demostrado que el E₂ aumenta la expresión de Tau y la inmunopositividad a MAP2 en cultivos hipotalámicos

pero no de tubulina (Ferrerira y Caceres, 1991; Dueñas et al., 1996), así como el tratamiento con E₂ disminuye la fosforilación de Tau en neuronas corticales e hipocampales, en cultivos de hipocampo y en el hipocampo *in vivo* (Cardona-Gomez et al. , 2004; Alavarez-de-la-Rosa et al., 2005; Goodenough et al. , 2005). Estudios *in vivo* utilizando homogenizados de hipófisis de ratas tratadas con E₂ han mostrado que éste induce la expresión de MAP2 y Tau, pero no de tubulina. Además el E₂ disminuye la proteína Tau total así como desfosforilada en la corteza entorrinal de ratones Ts65Dn, modelo animal del Síndrome de Down (Hunter et al, 2004), sugiriendo que la hormona podría disminuir la hiperfosforilación de la proteína, la cual es asociada a varias enfermedades neurodegenerativas.

Por otro lado, se ha observado que los tratamientos con E₂ a diferentes dosis, modulan la cascada de señalización para la fosforilación de Tau. El tratamiento con E₂, *in vivo*, induce una activación transitoria de GSK3 en rata hembra adulta en el hipocampo, seguido de una inhibición más sostenida. (Cardona-Gomez et al, 2004).

Los tratamientos con E₂ a diferentes dosis, modulan a la alza el contenido de las formas fosforiladas tanto de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), así como Akt, en el hipotálamo de ratas adultas ovariectomizadas (OVX) (Cardona-Gomez et al, 2002)

Se ha observado que *in vivo*, los tratamientos con progesterona (P₄) así como sus metabolitos (dihidroprogesterona y tetrahidroprogesterona) producen disminución en la expresión de la proteína Tau y de GSK3 en el Cerebelo. Además el tratamiento con la P₄ incrementa la fosforilación de la proteína Tau y este efecto fue acompañado por la disminución en la fosforilación de GSK3 en la serina 9, el cual es asociado con un incremento

en la actividad, no observándose modificación alguna en el hipotálamo (Guerra Araiza y cols., 2007).

JUSTIFICACIÓN

El intenso interés en las circunstancias bajo las cuales el estradiol funciona como un factor protector de muchos sistemas fisiológicos resulta de tres áreas convergentes de conocimiento. Primero, se ha empezado a apreciar que en adición a sus bien reconocidos efectos en el eje reproductivo y los órganos reproductivos blanco tradicionales, el estradiol es una hormona pleiotrópica que influencia numerosas funciones no reproductivas tales como el hueso y el metabolismo mineral, función cardíaca y vascular, memoria, aprendizaje y humor, y la incidencia y progresión de enfermedades relacionadas con la edad. Segundo, el descubrimiento de tres tipos de receptores para estrógenos ha conducido a reevaluar nuevos blancos potenciales y diversos mecanismos de acción del estradiol que no habían sido considerados previamente. Tercero, durante la década pasada, la esperanza de vida incrementó dramáticamente de 50 a más de 80 años, mientras que la edad de aparición de la menopausia se ha mantenido esencialmente fija. Así una proporción más grande de mujeres pasará aproximadamente 30 años de su vida en el estado hipoestrogénico postmenopáusico.

Debido a que el estradiol influencia múltiples sistemas fisiológicos, el cese de los ciclos menstruales y el consecuente hipoestrogenismo, impacta ampliamente la salud de la mujer. Claramente, el entendimiento de las circunstancias bajo las cuales el estradiol ejerce acciones de protección y los mecanismos celulares y moleculares que subyacen estas acciones no reproductivas proveerá información crucial para prevenir las consecuencias deletéreas del hipoestrogenismo prolongado y mejorar la salud de la mujer.

HIPÓTESIS.

Si los efectos neuroprotectores del E₂ y la P₄ tienen efecto sobre los complejos Cdk2/ciclina A y Cdk5/p35-p25 en las neuronas colinérgicas del CBA, entonces el efecto benéfico de la TRH con E₂ y la P₄ sobre la capacidad cognitiva se relacionará con el contenido de las proteínas que participan en dichos complejos en el CBA de la rata ovariectomizada.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar los efectos de la terapia de reemplazo con E₂ y la P₄ sobre el contenido de los complejos Cdk5/p35 y CiclinaA/Cdk2 en neuronas colinérgicas del CBA y sobre la capacidad cognitiva de la rata ovariectomizada.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar el efecto de la ovariectomía y del tratamiento con diferentes dosis de E₂ y P₄ sobre la capacidad cognitiva de la rata.
2. Evaluar el efecto de la ovariectomía y del tratamiento con diferentes dosis de E₂ y P₄ sobre el contenido de Cdk5, p35, p25, Tau total y PHF-1 en el CBA de la rata.
3. Evaluar el efecto de la ovariectomía y del tratamiento con diferentes dosis de E₂ y P₄ sobre el contenido Ciclina A y Cdk2 en el CBA de la rata.

METODOLOGIA

Animales y grupos de tratamiento

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley de 200-250 g de peso con una $n = 8$ por grupo de tratamiento.

A todos los animales se les realizó ovariectomía bilateral bajo anestesia para simular un modelo de posmenopausia. Inmediatamente después de la cirugía, se dividieron aleatoriamente en grupos de tratamiento a 2 semanas: control (vehículo); 0.4, 4 y 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de E_2 ; y 0.04, 0.4 y 4 mg/kg de P_4 .

Prueba de autoaprendizaje

Una vez que se cumplió el tiempo post-OVX se evaluó la capacidad cognitiva de las ratas en el modelo de aprendizaje de tipo automoldeamiento. Los animales de experimentación se mantuvieron bajo condiciones de luz controlada 12:12h (10:00 am - 10:00 pm) en ciclo invertido una semana antes de iniciar el entrenamiento. El entrenamiento se realizó en una caja de Skinner de Med Associates Inc. (WMPC 1999). El procedimiento consiste en que el animal se “auto-enseña” a presionar una palanca y para que ocurra esto se les da una serie de ensayos que consisten en la presentación de una palanca y el encendido de un foco que ilumina la palanca por 1 min (Estimulo Condicionado, EC); al término de este periodo la luz se apaga y se entrega un trozo de comida (Estimulo Incondicionado), inmediatamente después se da inicio a otro ensayo. Si la rata recibe puntualmente comida cuando presiona la palanca, su tasa subsiguiente de presión de la palanca durante el EC aumenta por encima de la tasa espontánea (Respuesta Condicionada, RC). Después de un número de secuencias, el animal experimenta el EC y presenta la RC, tal como tocar o presionar la palanca. El incremento o decremento de RC se considera como una mejoría o deterioro del aprendizaje, respectivamente. Cada animal se colocó en la

cámara experimental por un periodo de habituación de 20 min. Se dieron tres sesiones: 20 ensayos las dos primeras y 10 ensayos en la última sesión, con 24 h de diferencia entre cada una.

La caja de Skinner se encuentra conectada a un sistema de cómputo, el cual posee un software que permite, automáticamente suministrar una esfera de alimento cada vez que el animal presenta una RC. Asimismo, permite visualizar el número total de RC durante cada ensayo (Navarrete, 2008).

Prueba de actividad espontánea.

Con el fin de descartar cualquier alteración motora que pudiera afectar el desempeño de los animales en las pruebas de memoria y aprendizaje, se monitoreó la actividad espontánea de las ratas. Para ello, cada animal se colocó durante 5 minutos dentro de una caja de acrílico de 10 x 20 x 40 cm la cual contiene sensores que permiten contabilizar automáticamente la actividad general del animal. Esta prueba detecta tanto la movilidad total que tenga el animal durante el tiempo de experimentación así como la actividad ambulatoria y vertical.

Obtención de tejido

Después de las pruebas conductuales, un subgrupo de animales (n=5) de cada grupo de tratamiento se sacrificó por decapitación, se removió el cerebro y se disecó el CBA, según el Atlas de Paxinos y Watson (1986). Los tejidos se almacenaron para su conservación a -80°C y posterior análisis mediante la técnica de inmuno blot.

Inmuno Blot

Cada una de las áreas cerebrales disecadas se homogeneizó en un buffer de lisis (ver apéndice I). Los homogeneizados se centrifugaron a 12500 rpm durante 30 minutos y se determinó la concentración de proteína del sobrenadante por el método de Bradford (Bio-Rad) (ver apéndice I). Las muestras conteniendo 30 µg de la proteína total se analizaron por geles de poliacrilamida-SDS al 10% y después se transfirieron a membranas inmobilon-P (Millipore). Los anticuerpos utilizados fueron comprados a Santa Cruz Biotechnology, inc, excepto PHF-1 el cual fue adquirido de Millipore. Los anticuerpos, los proveedores y las diluciones utilizadas se muestran en la **Tabla 1**. Para la inmunodetección de las proteínas Ciclina A, Tau total y PHF-1, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos a 4°C toda la noche. Posteriormente, las membranas se lavaron en solución fosfato-salina (PBS) y se incubaron con los anticuerpos secundarios a temperatura ambiente por una hora. Para la detección, se utilizó un sistema de quimioluminiscencia ECL (Millipore) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El resto de las proteínas fueron incubadas en un sistema de vacío: SNAPid protein detection system (Millipore, WBAVDATABASE). El anticuerpo p35 (C19) detecta ambas proteínas p35 y p25.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en el estudio.

ANTICUERPO	DISTRIBUIDOR	CATÁLOGO	ESPECIE	DILUCIÓN
p35 (C19)	Millipore	05-522	mouse IgG	1:333 SNAPid
Cdk5 (J-3)	Santa Cruz	sc-820	rabbit IgG	1:333 SNAPid
Cdk2 (D-12)	Santa Cruz	sc6247	mouse IgG1	1:166 SNAPid
Cyclin A (H-432)	Santa Cruz	sc6248	mouse IgG1	1:500
Tau total	Santa Cruz	sc751	rabbit IgG	1:500
PHF-1	Abcam	Ab32057-100	Rabbit IgG	1:500

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos se realizó mediante ANOVA de una vía y un prueba post hoc de Tuckey para comparación entre medias, con una $p < 0.05$.

RESULTADOS.

1. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal, a corto plazo, sobre la capacidad cognitiva de la rata.

El efecto de la ovariectomía y de los tratamientos utilizados sobre la capacidad cognitiva de la rata se muestran en la Figura 18. Se registraron los resultados obtenidos en el tercer día de sesión, se promediaron y se expresaron como la media \pm EE. El análisis estadístico de los datos del modelo de autoaprendizaje encontró un aumento significativo en el número de RCs entre el grupo de tratamiento con E₂ 40 μ g/kg y P₄ 4mg/kg respecto al vehículo, E₂ 0.4 vs E₂ 4 y 40 μ g/kg (F 6, 31 = 12.17; p < 0.0001). Por otro lado, se encontró diferencia significativa entre las dosis de P₄ 0.4 mg/kg y P₄ 4 mg/kg vs P₄ 0.04mg/kg (p < 0.001) (Fig. 18).

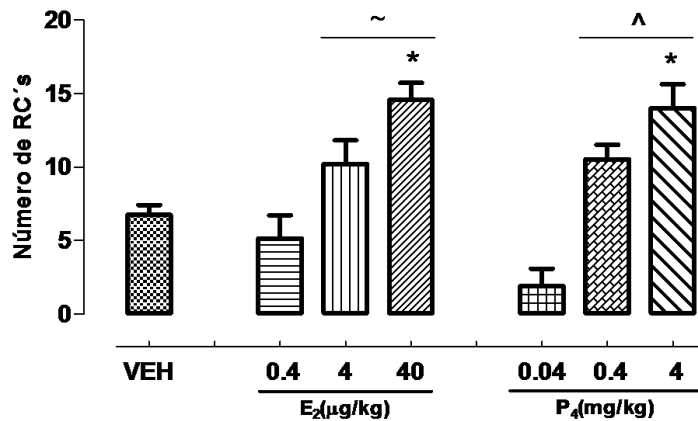


Fig. 18 Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre la capacidad cognitiva de la rata. Cada barra representa la media \pm E.E. de 8 animales. * p < 0.0001 vs VEH; ~ p < 0.0001 vs E₂ 0.4; ^ p < 0.0001 vs P₄ 0.04.

2. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal, a corto plazo, sobre la actividad espontánea de la rata.

Los resultados de la actividad espontánea de las ratas se presentan como la media \pm EE del número de cuentas en 5 minutos (**Fig. 19, 20 y 21**). Respecto a la actividad total, el análisis estadístico de los datos muestra una diferencia significativa entre el vehículo y los grupos con dosis de 0.4 μ g/kg de E₂ y 0.04 y 0.4 de P₄ ($p < 0.001$) (**Fig. 19**); además se observó diferencia significativa entre los grupos de E₂ 4, 40 μ g/kg vs 0.4 μ g/kg del mismo y entre el grupo de P₄ 4mg/kg vs P₄ 0.04 y P₄ 0.4mg/kg ($F_{6,42} = 20.36$) ($p < 0.0001$) (**Fig. 19**). Este último efecto se observa también al realizar el análisis de la actividad ambulatoria donde además se encuentra diferencia significativa entre el vehículo y los grupos de E₂ 4 y 40 μ g/kg así como de estos mismos grupos vs E₂ 0.4 μ g/kg ($F_{6,38} = 14.74$; $p < 0.0001$) (**Fig. 20**). El análisis de la actividad vertical (**Fig. 21**) no mostró diferencia significativa entre ningún grupo de tratamiento ($F_{6,40} = 2.3777$; $p = 0.9888$).

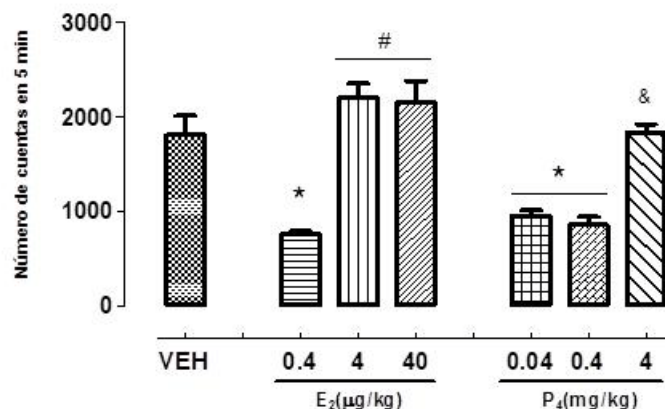


Figura 19. Efecto de la ovariectomía y de la terapia de reemplazo hormonal sobre la actividad espontánea total de la rata. Cada barra representa la media \pm EE de 8 animales. * $p < 0.001$ vs vehículo; # $p < 0.0001$ vs E₂ 0.4; & $p < 0.001$ vs P₄ 0.04 y P₄ 0.4.

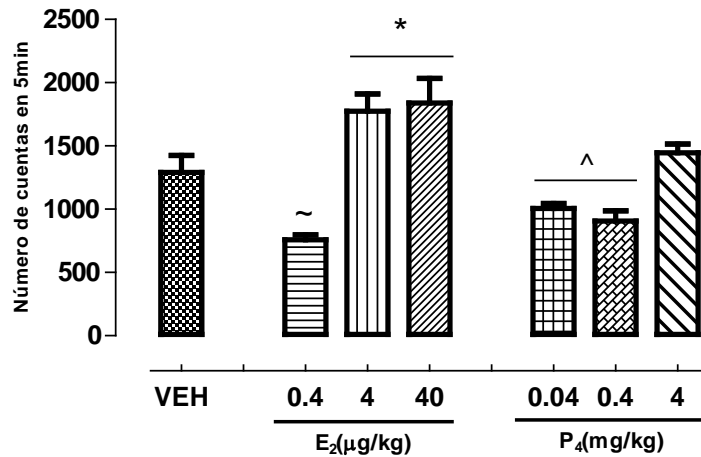


Figura 20. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre la actividad espontánea ambulatoria de la rata. Cada barra representa la media \pm EE de 8 animales. * $p < 0.001$ vs vehículo, $\sim p < 0.001$ vs E₂ 0.4 µg/kg; $\wedge p < 0.0001$ vs P₄ 4 mg/kg.

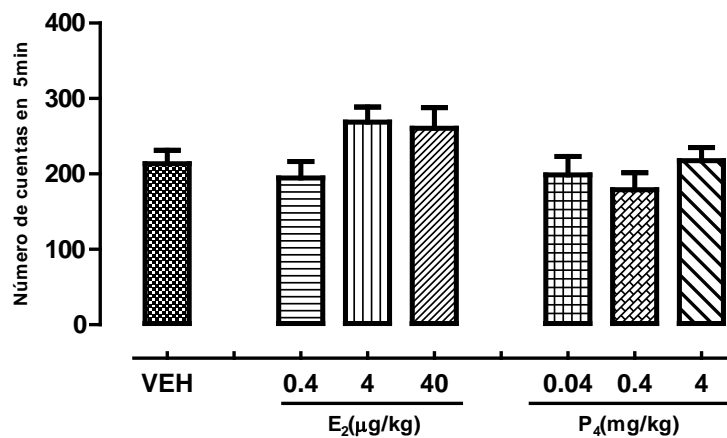


Figura 21. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre la actividad vertical de la rata. Cada barra representa la media \pm EE de 8 animales. $p = ns$.

2. Efecto de la ovariectomía y de del reemplazo hormonal, a corto plazo, sobre el contenido de la proteína Cdk5.

El análisis estadístico de los datos encontró una disminución significativa en el contenido de Cdk5 en el grupo de tratamiento con P₄ 4mg/kg respecto al vehículo (F 6, 14 = 9.887; p = <0.0002). Por otro lado, se encontró disminución significativa entre las dosis de P₄ 4 mg/kg respecto a las de 0.04 y 0.4mg/kg del mismo hormonal, se encontró además disminución significativa del contenido de Cdk5 en el grupo tratado con E₂ 4μg/kg vs los grupos con E₂ 0.4 y 4μg/kg (p<0.002) (**Fig. 22**).

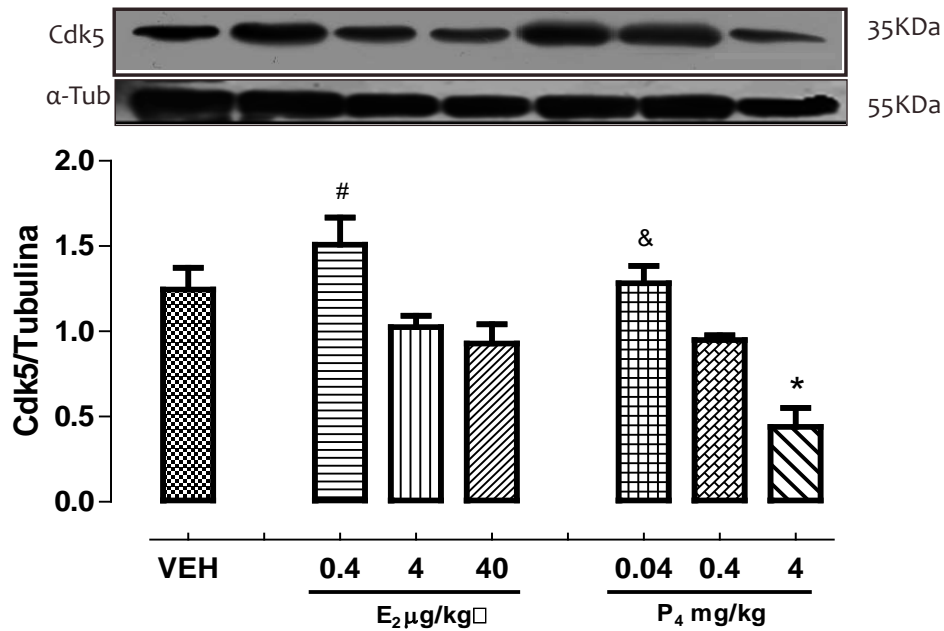


Fig.22. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre el contenido de Cdk5. Cada barra representa el promedio de una n=4. *p<0.05 vs VEH; #p<0.05 vs E4 y E40μg/kg; &p<0.05 vs P0.4 y P4mg/kg.

4. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre el contenido de p35.

El análisis estadístico de los datos mostró un incremento significativo del contenido de p35 en el grupo de tratamiento con 0.04mg/kg de P₄ respecto al grupo vehículo (F 6,14= 11.06) (p= 0.0001) (**Fig. 23**) y que con las dosis de E₂ 4 y 40µg/kg el contenido está significativamente reducido respecto al del mismo hormonal con dosis de 0.4µg/kg (p=0.001). Además se encontró disminución significativa del contenido de la proteína en los grupos tratados con 0.4 y 4mg/kg de P₄ respecto al grupo con 0.04mg/kg (p=0.0001).

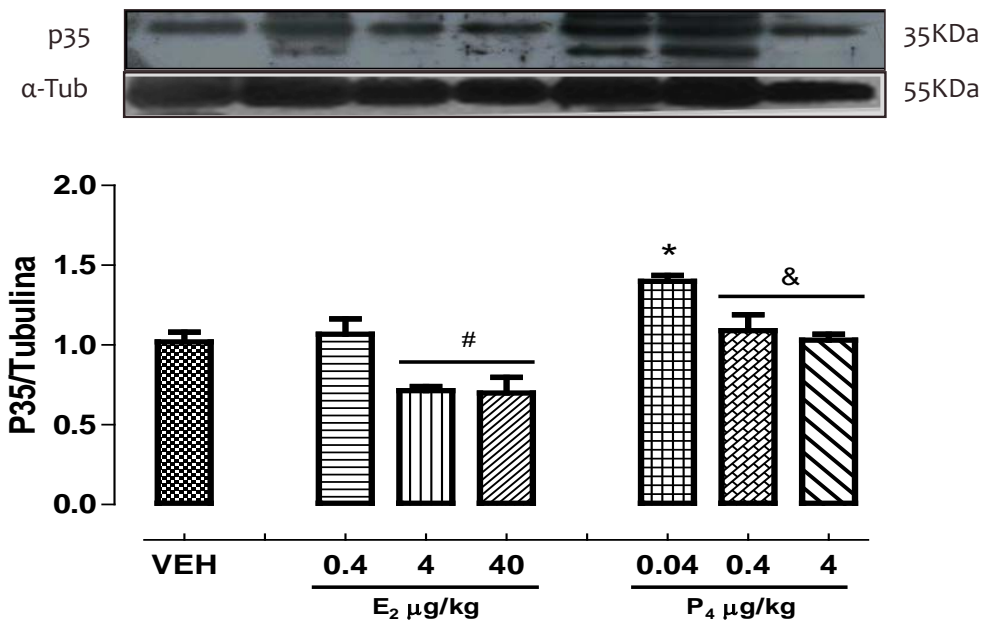


Figura 23. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre el contenido de p35. Cada barra representa la media de una n=4. *p<0.05 vs VEH; #p<0.05 vs E4 yE40µg/kg; &p<0.05 vs P0.4 y P4mg/kg.

4. Efecto de la ovariectomía y del y del reemplazo hormonal sobre el contenido de p25.

El análisis estadístico encontró un incremento significativo del contenido de p25 en los grupos tratados con 0.4 y 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de E_2 y con 0.04 mg/kg de P_4 respecto al encontrado en el grupo vehículo y una reducción del contenido de la proteína en el grupo tratado con 4 mg/kg ed P_4 respecto a los tratados con el mismo hormonal a dosis de 0.04 mg/kg ($F_{6,14} = 5.190$) ($p = 0.0053$) (**Fig. 24**).

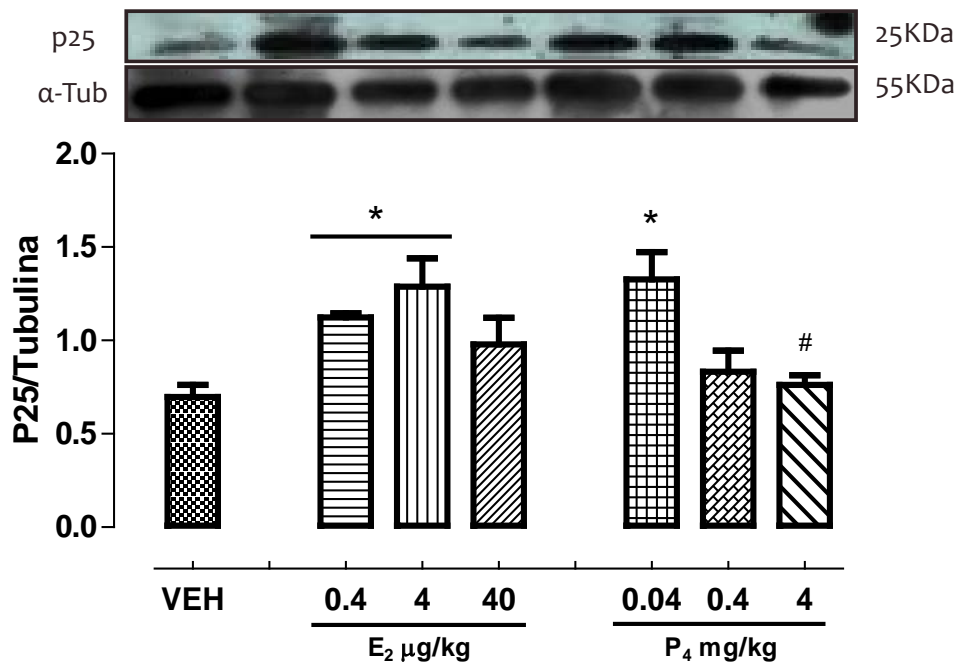


Figura 24. Efecto la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre el contenido de p25. Cada barra representa la media de una $n=4$. * $p < 0.05$ vs VEH; # $p < 0.05$ vs $\text{P}0.04\text{mg}/\text{kg}$.

6. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre la proporción Cdk5/p35.

El análisis estadístico encontró que únicamente la dosis de 4mg/kg de P₄ reduce de manera significativa la proporción Cdk5/p35 (F 6,14= 8.322) (p= 0.0006) y que esta proporción es menor a la encontrada en el resto de los grupos, excepto a la del grupo tratado con 0.4µg/kg de E₂, grupo contra el cual, no se encontró diferencia significativa (p=1.27) (Fig. 25).

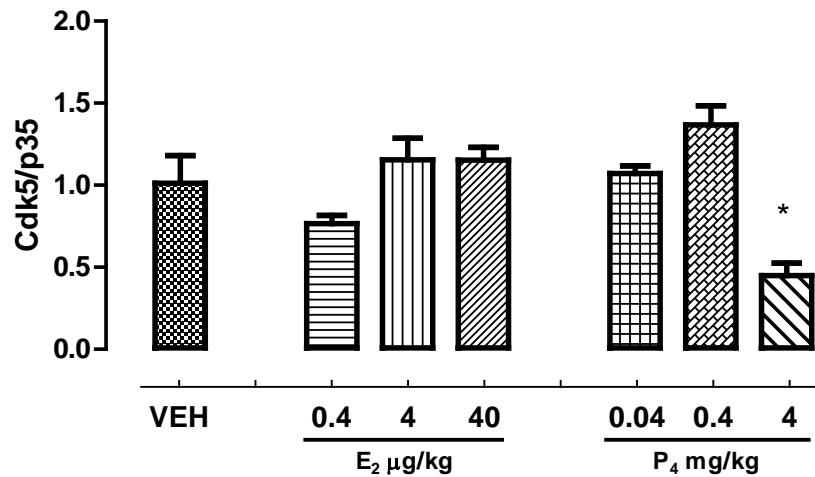


Fig 25. Relación Cdk5/p35. Cada barra representa la media +/- EE de una n=4. *p<0.05 vs veh, E₂ 4 y 40µg/kg, P₄ 0.04 y 0.4mg/kg.

7. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre la proporción Cdk5/p25.

El análisis estadístico encontró que en los grupos tratados con 4µg/kg de E₂ y 4mg/kg de P₄ se reduce significativamente la proporción Cdk5/p25 respecto a la encontrada en el grupo vehículo (F 6,7= 37.26) (p<0.0001). Además, dicha dosis de E₂ reduce la proporción Cdk5/p25 respecto a la encontrada con las dosis de 4 y 40g/kg del mismo hormonal. Y se encontró que la proporción

Cdk5/p25 también se encuentra reducida en el grupo tratado con 4mg/kg de P₄ respecto a la encontrada en los grupos con 0.04 y 0.4mg/kg del mismo hormonal (**Fig. 26**).

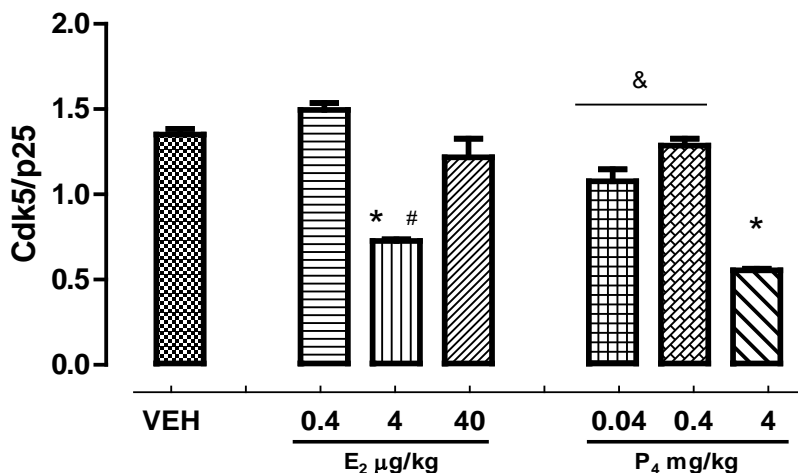


Fig 26. Relación Cdk5/p25. Cada barra representa la media de una n=4. *p<0.05 vs veh; #p<0.05 vs E₂ 0.4 y 40µg/kg; &p<0.05 vs P₄ 0.04 y 0.4mg/kg.

8. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre la proporción p35/p25.

El análisis estadístico encontró una proporción p35/p25 menor en todos los grupos de tratamiento respecto a la encontrada en el grupo vehículo (F 6,8= 50.87) y que dicha proporción tiene una disminución significativa en el grupo de animales tratados con 4 y 40µg/kg de E₂ respecto al grupo tratado con 0.4µg/kg del mismo hormonal (**Fig. 27**).

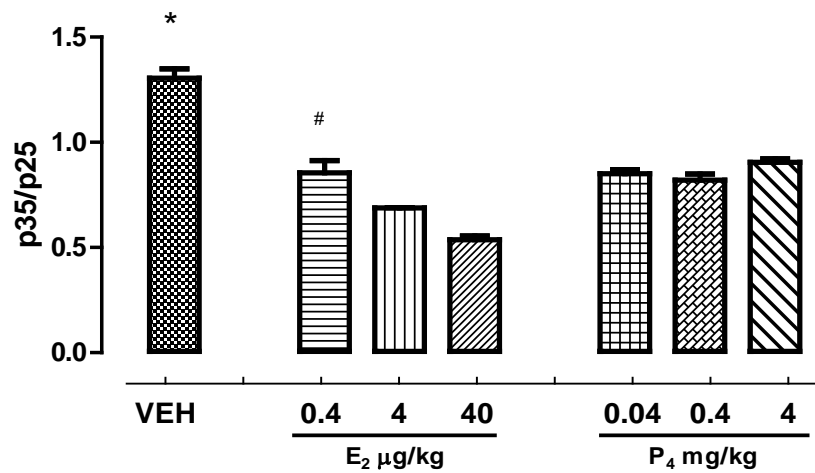


Fig 27. Relación p35/p25. Cada barra representa la media +/- una n=4. *p<0.05 vs todas; #p<0.05 vs E₂ 4 y 40µg/kg.

9. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre el contenido de la proteína Tau total.

El análisis estadístico encontró una reducción significativa del contenido de Tau tota en los grupos tratados con 4, 40µg/kg de E₂ y con todas as dosis de P4 respecto al encontrado en el grupo vehículo (F 6,7= 18.41) (p=0.0006). Además, el contenido de la proteína se encuentra disminuido significativamente en los grupos tratados con 4 y 40µg/kg de E₂ respecto al encontrado en el grupo tratado con dosis de 0.4µg/kg del mismo hormonal (**Fig. 28**).

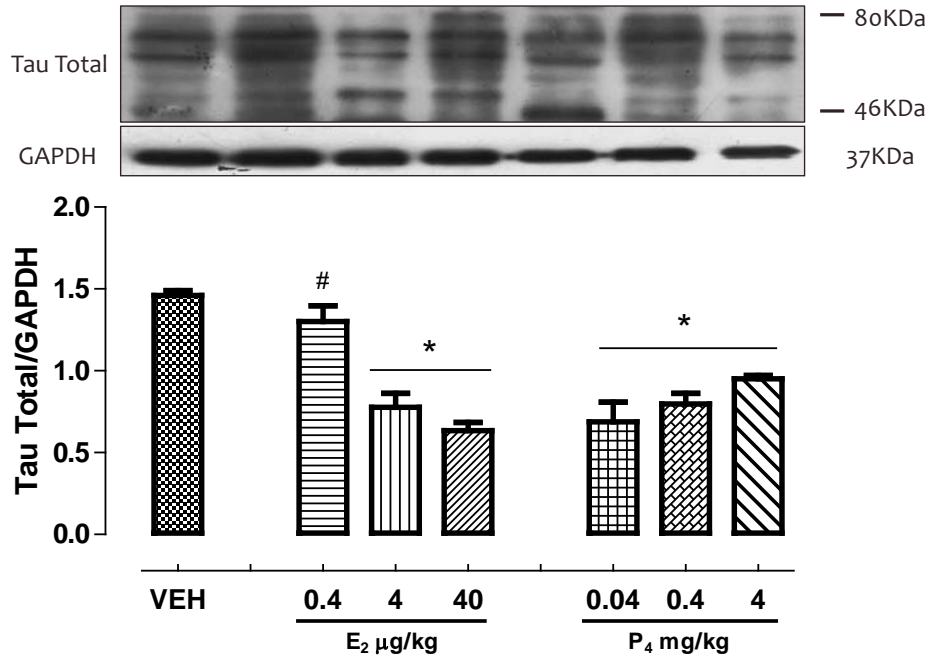


Figura 28. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre el contenido de Tau Total. Cada barra representa la media de una n=3. *p<0.05 vs VEH; #p<0.05 vs E4 y E40μg/kg.

10. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre el contenido de PHF-1.

El análisis estadístico de los datos encontró una reducción significativa del contenido de PHF-1 en el grupo tratado con 4μg/kg de E₂ respecto al encontrado en los grupos vehículo y los tratados con 0.4μg/kg de E₂ y 0.04mg/kg de P₄ (F_{6,9}= 4.118) (p=0.0287) (**Fig 31**).

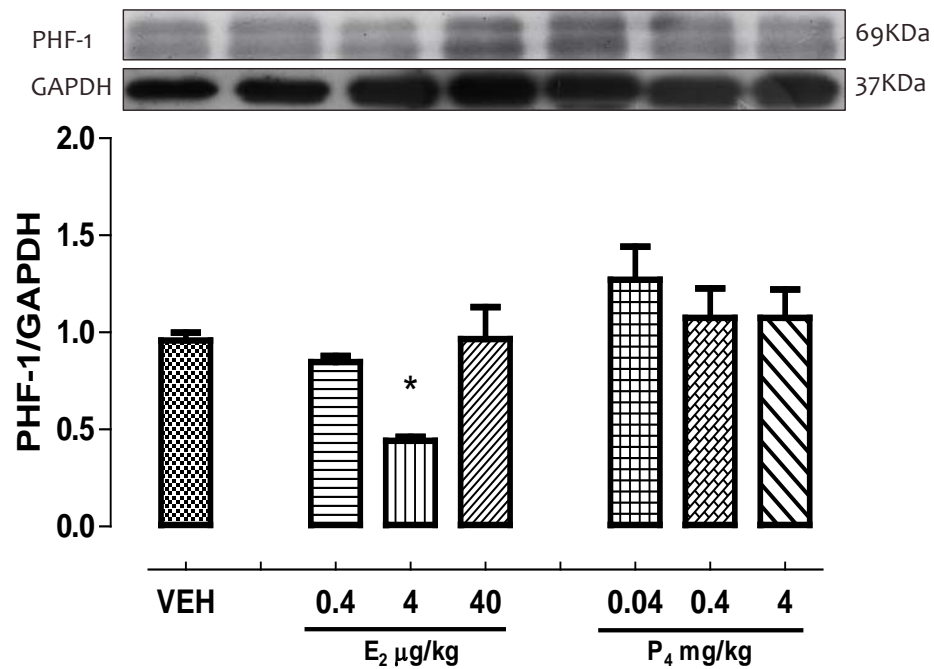


Figura 29. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre el contenido de PHF-1. Cada barra representa la media de una n=3. *p<0.05 vs VEH, E₂0.4μg/kg y P₄0.04mg/kg.

11. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre la proporción PHF-1/Tau.

El análisis estadístico de los datos encontró un incremento significativo de la proporción PHF-1/Tau en el grupo tratado con 0.004mg/kg de P₄ respecto a la encontrada en el resto de los tratamientos, incluyendo el grupo vehículo (F_{6,7}= 8.635) (**Fig. 32**).

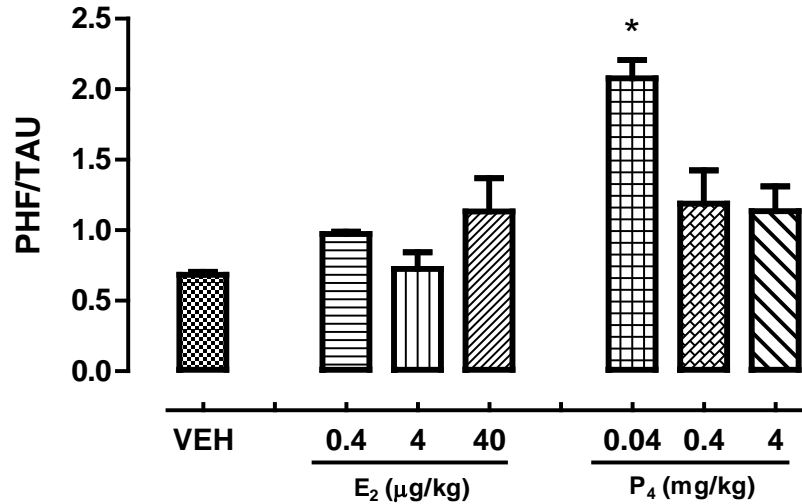


Fig 30. Relación PHF-1/Tau. Cada barra representa la media de una n de 3.
*p<0.05 vs todas.

12. Ecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre el contenido de la proteína Cdk2.

El análisis estadístico encontró un incremento significativo del contenido de Cdk2 en los grupos tratados con 0.4 y 40μg/kg de E₂ respecto al grupo vehículo (F_{6,7}= 10.09) (p=0.0038), y encontró que la dosis de 4mg/kg de P₄ reduce de manera significativa el contenido de la proteína respecto al encontrado en el grupo tratado con 0.4μg/kg de E₂ (**Fig. 31**).

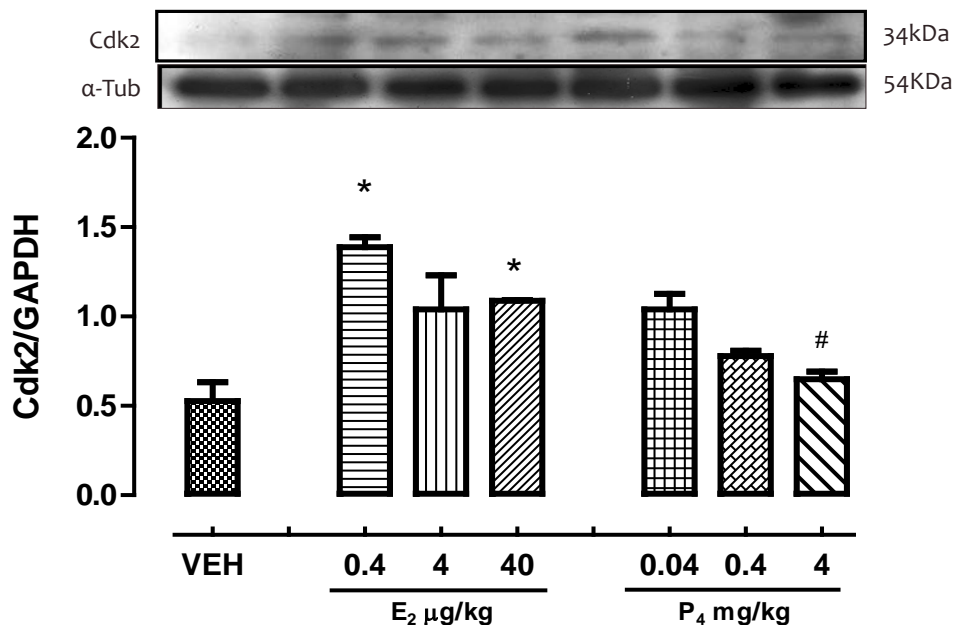


Figura 31. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre el contenido de Cdk2. Cada barra representa la media de una n=3. *p<0.05 vs VEH; #p<0.05 vs E₂0.4µg/kg.

13. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormona sobre el contenido de la proteína Ciclina A.

El análisis reportó un incremento del contenido de Cdk2 en el grupo tratado con 0.4µg/kg de E2 respecto al grup vehículo y a las otras dos dosis de este hormonal (F6, 7= 22.17). Además se encontró una reducción significativa del contenido de la proteína en el grupo de tratamiento con 4mg/kg de P₄ respecto al encontrado con la dosis de 0.04mg/kg del mismo hormonal (**Fig 32**).

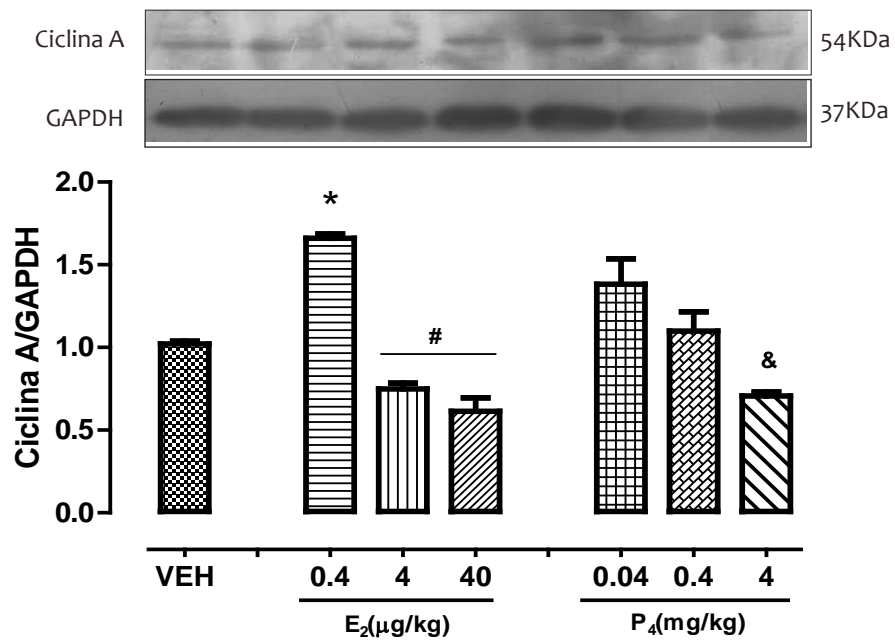


Figura 32. Efecto de la ovariectomía y del reemplazo hormonal sobre el contenido de Ciclina A. Cada barra representa la media de una n=3. *p<0.05 vs VEH; #p<0.05 vs E₂0.4μg/kg; &p<0.05 vs P₄0.04mg/kg.

DISCUSION

La OVX en ratas es un modelo *in vivo* comúnmente utilizado para mimetizar los cambios patofisiológicos en mujeres posmenopáusicas. Resulta en un decremento significativo en la actividad ChAT y la recaptura de alta afinidad de la ACh en el CBA, formación hipocampal y corteza. Asimismo, se asocia a un déficit progresivo de la memoria y a degeneración del sistema colinérgico del CBA (Singh, et al., 1994), lo cual puede ser revertido por el tratamiento agudo con niveles fisiológicos de estradiol (Gibbs, 1998; Wu, 2008). La declinación de la actividad ovárica después de la menopausia, natural o quirúrgica, parece afectar un número de de funciones cerebrales incluyendo ciertos tipos de memoria (McEwen y Alves, 1999).

El CBA contiene neuronas colinérgicas que proyectan a la corteza cerebral e hipocampo donde éstas juegan un importante papel en la función cognitiva. Experimentos donde se utiliza el modelo de OVX y TRH revelaron que el tratamiento con estrógenos incrementa la actividad de ChAT en las áreas de proyección del CBA (McEwen y Alves, 1999; Villarroya, 2001). Estos hallazgos apoyan la idea de que la pérdida de hormonas ováricas incrementa la vulnerabilidad de las células cerebrales al daño y a la degeneración (McEwen, 1999).

Los estrógenos influyen en varios sistemas de neurotransmisores: Ach, serotonina, norepinefrina. La neurotransmisión por Ach y su afectación por los estrógenos son de particular interés en el caso que nos ocupa, ya que tanto la atención como los procesos de la memoria y de aprendizaje están mediados por este neurotransmisor y son los puntos de afectación de las funciones cerebrales más llamativamente afectadas en la EA (Villarroya, 2001).

Aunque los estrógenos han demostrado ayudar a restaurar los déficits consecuentes a la OVX, es importante mencionar que la OVX, así como la menopausia, resulta en la pérdida precipitada no sólo de estrógenos sino también de P₄. Así, la pérdida de P₄ puede contribuir a los déficits observados después de la OVX o al riesgo incrementado de EA vistos en la menopausia (Singh, 2005).

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el tratamiento con E₂ o con P₄ a corto plazo de las ratas ovariectomizadas tienen un desempeño superior en las pruebas conductuales de memoria comparados con animales privados de estrógenos (Yaffe et al, 1998) ya que se observa que el desempeño de los animales en la prueba de automoldeamiento se ve mejorado de una manera dependiente de la dosis siendo las más efectivas las de 40µg/kg de E₂ y de 4mg/kg de P₄ (**Fig.18**). Estas dosis se consideran elevadas como lo que ocurre de manera fisiológica en el proestro del ciclo estral de la rata, etapa en la que se ha observado un incremento de la actividad de la AChT (Gibbs, 1998) sugiriendo que estas dosis son efectivas como neuroprotectoras en animales ovariectomizados.

De manera interesante, observamos que las dosis más bajas de E₂ y P₄ disminuyen la actividad ambulatoria y total de los animales y las dosis de 4 y 40µg/kg de E₂ incrementan su actividad ambulatoria (**Figs. 19, 20**). Sin embargo, no afectan la actividad vertical, la cual es indispensable para el desempeño en la prueba de automoldeamiento (**Fig. 21**) (Meneses, 2003). Este fenómeno puede explicarse por el efecto que tienen las hormonas ováricas sobre otros sistemas además del colinérgico como el serotoninérgico, dopaminérgico y noradrenérgico ya que todos contribuyen en muchos aspectos de la función cerebral incluyendo el estado afectivo, desórdenes del movimiento y de la función cognitiva (McEwen, 1999). Por ejemplo, se ha demostrado que la administración de E₂ o P₄ afecta

positivamente la expresión de la enzima triptófano hidroxilasa, enzima limitante para la síntesis de serotonina (McEwen, 1999).

Por otro lado, este hallazgo podría ser el resultado del efecto antidopaminérgico de altas dosis de E₂ (McEwen y Alves, 1999) sobre el receptor D4 de Dopamina. Diferentes estudios muestran que tanto E₂ como fármacos con actividad estrogénica regulan a la baja los niveles de la expresión génica del receptor D4 y el transportador de dopamina (Ishido, et al., 2004). Además, se ha reportado una modulación de la actividad locomotriz mediada colinérgicamente y relacionada con el CBA vía receptores muscarínicos M1 y M2 (Brudzynski, et al., 1991) y M4 (Bakri et al, 2002). De tal manera, los sistemas colinérgico y dopaminérgico podrían estar implicados en los efectos del E₂ sobre la actividad locomotriz en ratas.

Todavía no es clara la expresión de receptores P₄ (RP) en neuronas colinérgicas del CBA ni como son regulados por los cambios de circulación de estrógenos, aunque, una posibilidad es que algunos de estos efectos están mediados indirectamente vía grupos celulares no colinérgicos, los cuales podrían influenciar la función colinérgica del CBA (Gibbs, 1996). Tal como muestran estudios recientes donde la P₄ influencia los sistemas GABAérgicos (Alopregnanolona) y colinérgicos en el SNC (Dudchenko y Sarter, 1991). Por lo que el efecto que tienen las dosis bajas de este hormonal sobre la actividad ambulatoria reducida pueden ser explicados por su acción sobre el receptor GABA_A (Singh, 2005).

Diversos estudios atribuyen el efecto neuroprotector a la capacidad que tienen los estrógenos para modular la función de las neuronas colinérgicas (Gibbs 1998, Yaffe et al, 1998, Villarroya, 2001).

Nosotros proponemos que el efecto de los estrógenos sobre las neuronas colinérgicas del CBA puede estar mediado, en parte por su capacidad para modificar el contenido de Cdk's que pueden participar como cinasas de la proteína Tau cuya desregulación ha sido fuertemente implicada en el desarrollo de enfermedades neurdegenerativas como la EA (Hashiguchi et al, 2002; Lee et al, 2005; Hernández et al, 2011).

Diversos estudios sugieren que MAPK o GSK3 β podrían participar en la desregulación de la fosforilación de la proteína Tau pero éstos no excluyen la posibilidad de que otras cinasas estén involucradas (Baumanna et al 1993; Hashiguchi et al, 2002; Cruz et al, 2003). Por ejemplo, se ha demostrado en estudios previos que diferentes Cdk's, entre ellas Cdk2, tienen actividad cinasa sobre la proteína Tau (Hernández, 2011) e incluso se han determinado los sitios que puede fosforilar mostrando actividad en los residuos Ser199, Ser202, Ser325, Ser396 y Ser404 y en residuos de Thr mostrando preferencia por estos últimos como blanco de fosforilación (Baumanna et al, 1993).

Contrario a los estudios que han reportado que Cdk2 no está presente en el cerebro porcino (Baumanna et al, 1993) ni en el sistema septohipocampal de la rata (Fisher, 2002), nuestro estudio demostró la expresión constitutiva de esta proteína en el CBA de la rata. Además nuestros datos indican que el tratamiento hormonal con E₂ induce un incremento del contenido de Cdk2 y la subunidad activadora Ciclina A en el CBA mientras que el tratamiento con la P₄ no tiene efecto sobre estas proteína (**Fig. 31**). Esto sugiere que los efectos de E₂ a corto plazo sobre la fosforilación de la proteína Tau pueden estar mediados en parte por la acción del complejo Cdk2/Ciclina A. Aunque este fenómeno no se refleja en el contenido de la forma fosforilada de tau, PHF-1 pero esto puede ser explicado porque la fosforilación de Tau mediante Cdk2/Ciclina A se lleva a cabo principalmente en residuos Thr y el anticuerpo

PHF-1 detecta sólo la fosforilación en los residuos S404 y S396 (Otvos et al, 1994). Por lo que sería de gran utilidad realizar estudios para identificar la forma fosforilada de Tau en otros residuos. Y podemos apoyarlo con los datos que indican una reducción del contenido de Tau total con los diferentes tratamientos (**Fig. 28**) lo cual podría sugerir que se está fosforilando en sitios diferentes a los detectados por PHF-1.

Las ciclinas muestran cambios importantes en su concentración para regular de esta manera la actividad de las Cdk's (Morgan, 2007), estos cambios están mediados por cambios en la expresión de los genes que las codifican (Morgan, 2007) y por degradación mediante proteólisis (Harper y Adams, 2001; Morgan, 2007). Por lo anterior, podemos deducir entonces que la degradación de la Ciclina A incrementa con dosis elevadas de E₂ (**Fig 32**) lo cual deriva en la inactividad de Cdk2 y por lo tanto Tau ya no es fosforilada por este mecanismo.

Por otro lado, el incremento en el contenido de Cdk's o ciclinas en neuronas diferenciadas se ha considerado como marcador de la reentrada de las neuronas al ciclo celular lo cual deriva en neurodegeneración y se ha asociado con enfermedades como la EA (Wen et al, 2004; Hallene y Janigro, 2006; Sultana y Butterfield, 2006; Arendt, 2008; Hernández et al, 2011) e incluso se ha demostrado la presencia de Cdk2 en hipocampo y el lóbulo parietal inferior de pacientes con deterioro cognitivo (Sultana y Butterfield, 2006). Por lo anterior, la inducción temprana del complejo Cdk2/Ciclina A en el CBA de la rata puede considerarse un marcador de reentrada al ciclo celular de las neuronas que las conduciría a apoptosis por lo que se sugiere que las dosis de 4 y 40µg/kg de E2 pueden mediar un mecanismo neuroprotector al disminuir el contenido de la Ciclina A en el CBA de la rata y por lo tanto impedir la activación de Cdk2 y con esto la reentrada de las neuronas al ciclo celular.

El contenido de p25, un activador de Cdk5 cuya actividad se ha asociado con eventos patológicos en la fosforilación de Tau (Hashiguchi et al, 2002; Cruz et al, 2004) se encuentra incrementado con el tratamiento de E₂ a dosis de 0.4 y 4µg/kg y P₄ a dosis de 0.04mg/kg mientras que las dosis de 40µg/kg y 4mg/kg de dichos tratamientos, respectivamente, mantiene el contenido de esta proteína igual que el de los animales sin tratamiento (**Fig 24**), únicamente la dosis de 4µg/kg de E₂ y de 4mg/kg de P₄ reducen el contenido de p25 en relación al de Cdk5 por lo que se sugiere que ambos tratamientos modulan la actividad de Cdk5 reduciendo su interacción con p25 para evitar el daño neuronal que pudiera resultar al exponer a Tau a hiperfosforilación.

El contenido de la proteína p35 se mantiene igual o superior (con dosis de 0.04mg/kg de P₄) al encontrado en los animales sin tratamiento (**Fig 23**) lo cual es indispensable para mantener la actividad cinasa fisiológica de Cdk5 sobre sus sustratos (Dhavan y Tsai, 2001, Cruz et al, 2004), cabe señalar que cuando se incrementa la dosis de los hormonales, se observa que el contenido de p35 se reduce lo cual puede ser explicado por una mayor interacción de esta proteína con Cdk5 cuya relación, a excepción del grupo tratado con 4mg/kg de P₄, también se mantiene en todos los grupos de tratamiento (**Fig 25**) ya que la actividad cinasa del complejo Cdk5/p35 se considera un mecanismo de retroalimentación para la degradación de p35 (Dhavan y Tsai, 2001).

Respecto a los cambios que ejerce la dosis de 4mg/kg de P₄, se observa que este tratamiento reduce el contenido de todas las proteínas que participan sobre el complejo Cdk5/p35-p25 así como la relación entre ellas (**Figs 22-27**) lo cual sugiere que esta dosis reduce la actividad de este complejo como un mecanismo protector que impide la hiperfosforilación de Tau.

Aunque el contenido de p35 disminuye y el de p25 aumenta con dosis de E₂ 4µg/kg en relación al resto de las dosis de E₂, se observa que con dicha dosis, p25 está reducida en relación a Cdk5 (**Fig 26**) e incluso es menor que la observada en el grupo de animales sin tratamiento lo cual sugiere que con esta dosis de E₂ la interacción Cdk5/p25 es reducida y por lo tanto, el contenido de PHF-1 con este tratamiento se observa menor que la del resto de los grupos (**Fig 29**).

En el grupo de animales que no recibieron tratamiento se observa que p35 mantiene un contenido mayor que el de p25 (**Fig 27**) e incluso esta relación es mayor que la que se observa en los animales que recibieron cualquier tratamiento hormonal esto podría sugerir un mecanismo en el cual las diferentes dosis de E₂ y P₄ estén mediando la escisión de p35 para formar p25 y así permitir a corto plazo un incremento de la actividad fisiológica de Cdk5 sobre sus sustratos como medida compensatoria ante eventos de daño neuronal (Fisher, 2002) ya que se ha demostrado que un incremento transitorio del nivel de p25 puede facilitar la neuroplasticidad e incluso se considera que la generación de p25 durante el envejecimiento y la EA podría inicialmente ser un evento compensatorio para incrementar la neuroplasticidad pero eventualmente contribuye a la patogénesis de la EA cuando se incrementa de manera crónica (Fisher y Tsai, 2008). Lo anterior, en adición a que la vida media de p35 es menor que la de p25 (Cruz y Tsai, 2004) podría explicar porqué se observa un incremento del contenido de p25 en relación al de p35 en los grupos de animales tratados con E₂ a dosis de 4 y 40µg/kg (**Fig 27**).

Dos importantes modificaciones de la molécula de Tau se han encontrado asociadas con la formación de PHF. Primero, los PHF's consisten en Tau ampliamente hiperfosforilada, aunque la razón precisa para la acumulación de Tau en este estado no se conoce, la evidencia indica que esto puede

estar relacionado con un incremento en la actividad cinasa o una disminución en la actividad fosfatasa (Abraha et al 2000). Segundo, parece que la Tau fosforilada anormalmente tiene una afinidad incrementada por la Tau normal reclutándola dentro de un estado agregado e inhibiendo su unión a microtúbulos (Abraha et al 2000).

Nuestro datos muestran que todos los tratamientos a excepción de E₂ 0.4µg/kg reducen el contenido de Tau total (**Fig 28**) respecto al contenido de ésta encontrado en el grupo vehículo. En adición, a pesar de los cambios inducidos sobre los diferentes complejos mediante los tratamientos hormonales, el contenido de PHF-1 no se observa incrementado e incluso se reduce con el tratamiento de 4µg/kg de E₂, sin embargo, en relación al contenido de Tau total (**Fig 30**) este efecto se pierde y solo se observa que el tratamiento con 0.04mg/kg de P₄ mantiene incrementado el contenido de PHF-1. Estos datos sugieren que a corto plazo la actividad cinasa/fosfatasa ejercida sobre la proteína Tau se mantiene en equilibrio independientemente de la cinasa que participe en la fosforilación y que el complejo Cdk5/p25 puede estar mediando la fosforilación sostenida de Tau en el tratamiento con P₄ a dosis de 0.04mg/kg con la consiguiente acumulación de esta proteína.

Como se ha demostrado recientemente, existe un vínculo entre los fenómenos de neuroplasticidad y muerte neuronal mediados por la actividad de diferentes Cdk's y sus activadores (Fisher y Tsai, 2008; Arendt, 2008; Hernández et al, 2011), nuestro estudio apoya la hipótesis de que a corto plazo, la presencia de los complejos Cdk/ciclina en neuronas maduras puede reflejar su papel en la estabilización y regulación de la dinámica del citoesqueleto durante la adaptación morfogenética y que Tau, en adición, puede actuar como un blanco de fosforilación (Hernández et al, 2011) y que la fosforilación y acumulación de Tau fosforilada puede representar una

respuesta protectora que sirve como manifestación de la adaptación celular para proteger a las neuronas susceptibles al daño (Lee et al 2005).

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento a corto plazo con E₂ y P₄ tiene efecto sobre el contenido de los complejos Cdk/Ciclina y Cdk5/p35-25 y que ambos pueden estar participando en la fosforilación de la MAP Tau. Sin embargo, para aclarar de manera más amplia la interacción de estas proteínas y su respuesta a la TRH, resulta de gran utilidad el estudio posterior de dicho mecanismo a largo plazo y así como la identificación de otros residuos susceptibles a fosforilación por estos complejos en la proteína Tau.

CONCLUSIONES.

- La TRH con E2 y P4 incrementa la capacidad cognitiva de la rata ovariectomizada de una manera dependiente de la dosis.
- La TRH con E2 y P4 incrementa el contenido de las proteínas que participan en los complejos Cdk5/p35-p25 y Cdk2/Ciclina A en el CBA, un efecto que regula el proceso de fosforilación de la proteína Tau y con esto, la estabilidad de las neuronas colinérgicas.

REFERENCIAS.

1. Abraha Aida, Ghoshal Nupur, Gamblin T. Chris, Cryns Vincent, Berry Robert W., Kuret Jeff and Binder Lester I. 2000. C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *Journal of Cell Science* 113, 3737-3745.
2. Alanís NJessica, Garza M. Vanessa, González A. Andrés. 2008. Prevalencia de demencia en pacientes geriátricos.. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*; 46 (1): 27-32
3. Almaguer Melián W. Bergado Rosado J.A. 2002. Interacciones entre el hipocampo y la amígdala en procesos de plasticidad sináptica. Una clave para entender las relaciones entre motivación y memoria. *Review Neurology*; 35(6): 586-593.
4. Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K. 1997. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci.* 7;94(1):298-303.
5. Altucci Lucia, Addeo Raffaele, Cicatiello Luigi, Germano Domenico, Pacilio Carmen, Battista Tullio, Cancemi Massimo, Belsito Valeria Petrizzi, Bresciani Francesco, and Weisz Alessandro. 1997. Estrogen Induces Early and Timed Activation of Cyclin-Dependent Kinases 4, 5, and 6 and Increases Messenger Ribonucleic Acid Expression in Rat Uterus *Endocrinology.* Vol. 138, No. 3.
6. Alvarez de la Rosa M, Silva I, Nilsen J. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1052:210-224
7. Avila Jesús, Lucas José, Pérez Mar and Hernández Félix. 2004. Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions. *Physiol Rev.* 84: 361–384.
8. Arendt T. 2008. Differentiation and De-Differentiation—Neuronal Cell-Cycle Regulation During Development and Age-Related Neurodegenerative Disorders. Springer Science+Business Media, LLC.p157.
9. Bakri Nahid K. , Adem A., Suliman I.A., Mulugeta E., Karlsson E., Lindgren J.U., Winblad B., Islam A. 2002. Estrogen and progesterone

treatment: effects on muscarinic M4 receptor subtype in the rat brain. *Brain Research* 948, 131–137.

10. Bernston, G.G., Shafi, R. y Sarter, M. (2002). Specific contributions of the basal forebrain corticopetal cholinergic system to electroencephalographic activity and sleep/waking behaviour. *The European Journal of Neuroscience*, 16:2453-2461.
11. Bitran Daniel, Hilvers Robert J. and Kellogg Carol K. 1991. Anxiolytic effects of 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABA A receptor. *Brain Research*, 561 (1991) 157-161.
12. Bohacek J, Bearl AM, Daniel JM. 2008. Long term hormone ovarian deprivation alters the ability of subsequent oestradiol replacement to regulate choline acetyltransferase protein level in the hippocampus and prefrontal cortex of middle-aged rats. *JNeuroendocrinol*. 20(8):1023-7
13. Bonomo S.M., Rigamonti A.E., Giunta M., Galimberti D., Guaita A., Gagliano M.G., Müller E.E., Cella S.G. 2009. Menopausal transition: A possible risk factor for brain pathologic events. *Neurobiology of Aging*. 30:71–80.
14. Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82(4):239-59.
15. Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.*; 33:95-130.
16. Camacho Arroyo I., Reyna Neyra A., Mercado Gómez O., Arias Clorinda (2004). The rol of estradiol and progesterone in the regulation of cytoesqueletal proteins in the central nervous system. *Research Signpost*. 37/661(2):143-161.
17. Cardona-Gomez P, Perez M, Garcia-Segura LM. 2002 Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res.*; 107:80-8.
18. Cardona-Gómez, P., Pérez, M., Avila, J., García-Segura, L. M., and Wandosell, F. 2004. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction

of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus
Mol. Cell. Neurosci. 25, 363-373.

19. Conneely Orla M., Biserka Mulac-Jericevic, Francesco Demayo, John P. Lydon, and Bert W. O'Malley. 2002. Reproductive Functions of Progesterone Receptors Recent Progress in Hormone Research 57:339-355.
20. Correa M. (2007). Functional neuroanatomy of implicit learning: associative, motor and habit. Review Neurology; 44(4): 234-242.
21. Cruz Jonathan C., Tseng Huang-Chun, Goldman Joseph A., Shih Heather, and Tsai Li-Huei. 2003. Aberrant Cdk5 Activation by p25 Triggers Pathological Events Leading to Neurodegeneration and Neurofibrillary Tangles. Neuron. Vol. 40, 471–483.
22. Cruz Jonathan C. and Tsai Li-Huei. 2004. Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease TRENDS in Molecular Medicine Vol.10 No.9.
23. Dhavan Rani and Tsai Li-Huei. 2001. A Decade of Cdk5. Nature reviews. Molecular cell biology. Vol 2 749-759
24. Dawbarn, D., Allen, S.J. (2003). Neurotrophins and neurodegeneration. Neuropathol Appl Neurobiology. 29: 211-230.
25. Diaz Brinton Roberta (2001). Disease: Recent Insights and Remaining Challenges Memory Function and Neuroprotection Against Alzheimer's Cellular and Molecular Mechanisms of Estrogen Regulation. Learning and Memory. 8: 121-133.
26. Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Kindy MS, Wise PM. 2001. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 13; 98(4): 1952-7.
27. Fischer Andre', Sananbenesi Farahnaz, Schrick Christina, Spiess Joachim, and Radulovic Jelena. 2002. Cyclin-Dependent Kinase 5 Is Required for Associative Learning. The Journal of Neuroscience, May, 22(9):3700–3707.
28. Frye Cheryl A., Walf Alicia A., Rhodes Madeline E., Harney Jacob P. 2004. Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic, and

antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type 1 5 α -reductase. *Brain Research* 1004 (2004) 116– 124.

29. Fraile I. G., McEwen B. S. and Pfaf D. W. 1987. Comparative Effects of Progesterone and Alphaxalone on Aggressive, Reproductive and Locomotor Behaviors. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, Vol. 30, pp. 729-735.
30. Frick Karyn M. 2009. Estrogens and age-related memory decline in rodents: what have we learned and where do we go from here? *Horm Behav.* 55(1): 2–23.
31. Fischer Andre and Tsai Li-Huei. 2008. Cyclin-Dependent Kinase 5 (Cdk5): Linking Synaptic Plasticity and Neurodegeneration. DOI: 10.1007/978-0-387-78887-6_17. Springer Science&Business Media, LLC.
32. Gillies Glenda E. and McArthur Simon. 2010. Estrogen Actions in the Brain and the Basis for Differential Action in Men and Women: A Case for Sex-Specific Medicines. *Pharmacol Rev* 62:155–198.
33. Gibbs, R.B., (1996). Fluctuations in Relative Levels of choline acetyltransferase mRNA in different regions of the rat basal forebrain across the estrous cycle: effects of the estrogen and progesterone. *J Neurosci.* 16: 1049-1055.
34. Gibbs, R.B., (1996). Fluctuations in Relative Levels of choline acetyltransferase mRNA in different regions of the rat basal forebrain across the estrous cycle: effects of the estrogen and progesterone. *J Neurosci.* 16: 1049-1055.
35. Gibbs R. B. (2010). Estrogen therapy and cognition: a review of the cholinergic hypothesis. *Endocrine Reviews.* 31(2): 224-253.
36. Goodenough S, Schleusner D, Pietrzik C, Skutella T, Behl C. Glycogen synthase kinase 3b links neuroprotection by 17 β -estradiol to key Alzheimer processes. *Neuroscience* 2005; 132:581–9.

37. González Arenas A, Neri Gómez T, Guerra Araiza C, Camacho-Arroyo I. (2004). Sexual dimorphism in the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors in the lung of adult rats.
38. Guerra-Araiza Christian, Amorim Miguel A.R., Camacho-Arroyo Ignacio, Garcia-Segura Luis M. 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*. DOI 10.1002/dneu.20383.
39. Hallene Kerri L. and Janigro Damir. 2006. The Cell Cycle in the Central Nervous System. En "Cell Cycle, Neurological Disorders, and Reactive Gliosis" *Contemporary Neuroscience*. III, 163-175.
40. Harper J. W. and Adams P. D. 2001. Cyclin-Dependent Kinases. *Chem. Rev.*, 101, 2511-2526.
41. Hashiguchi Mitsuko, Saito Taro, Hisanaga Shin-ichi, and Hashiguchi Toshio. 2002. Truncation of CDK5 Activator p35 Induces Intensive Phosphorylation of Ser202/Thr205 of Human Tau. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (46). p. 44525–44530.
42. Heldring Nina, Pike Ashley, Andersson Sandra, Matthews Jason, Cheng Guojun, Hartman Johan, Tujague Michel, Ström Anders, Treuter Eckardt, Warner Margaret, Gustafsson Jan-Åke (2007). Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiology Review*. 87:905-931.
43. Henderson, V.W. 2000a. Hormone therapy and the brain: A clinical perspective on the role of estrogen. Parthenon Publishing, New York/London.
44. Henderson V.W.; Paganini-Hill A.; Miller B.L.; Elble R.J.; Reyes P.F.; Shoupe D.; McCleary C.A.; Klein R.A.; Hake A.M.; Farlow M.R. Estrogen for Alzheimer's disease in women. *Neurology* 2000b; 54:295–301

45. Hernández Ortega Karina, Quiroz Baez Ricaro, Clorinda Arias. 2011. Cell cycle reactivation in mature neurons: a kink with brain plasticity, neuronal injury and neurodegenerative diseases? *Neurosci Bull*, 27(3): 185-196.
46. Hunter CL, Bimonte-Nelson HA, Nelson M, Eckman CB, Granholm AC. 2004. Behavioral and neurobiological markers of Alzheimer's disease in Ts65Dn mice: Effects of estrogen. *Neurobiol Aging*.; 25:873–884.
47. Lee Hyoung-gon, Perry George, Moreira1Paula I., Garrett Matthew R., Liu Quan, Zhu Xiongwei, Takeda Atsushi, Nunomura Akihiko and Smith Mark A. 2005. Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends in Molecular Medicine* Vol.11 No.4.
48. Li Xiaotao and O'Malley Bert W. 2003. Unfolding the Action of Progesterone Receptors. *The journal of biological chemistry*. Vol. 278, No. 41. 2003. 39261–39264, 2003.
49. Llorente Vizcaíno A, Cejudo Bolívar JC. 2001. Memories and Alzheimer disease. *Rev Neurol*.30;32(12):1163-72.
50. Loose-Mitchel David S. y Stancel George M. Estrógenos y progestágenos (2003). En *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Eds. Hardman Joel G., Limbird Lee E., Molinoff Perry B., Ruddon Raymond W., Goodman Gilman Alfred. McGraw Hill Interamericana. 10a Ed. I (123-125).
51. Magdalini Tsintou. 2008. The role of tau protein in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Helmedica*, 6(7).
52. Malumbres Marcos and Barbacid Mariano. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences* Vol.30 No.11.
53. Mapelli Marina and Andrea Musacchio. 2003. The Structural perspective on CDK5. *Neurosignals*;12:164–172
54. Márquez Diana C. 2002. Receptor de Estrógenos. Bases aplicadas a la medicina. Facultad de Medicina. Unidad central de Venezuela. Academia Biomédica digital Vol 10 Enero-marzo.
55. McCarthy Margaret. Estradiol and development brain. *Physiol Rev* 88:91-134.
56. McEwen Bruce S., Alves Stephen E.1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Reviews* 20(3): 279–307.

57. McEwen Bruce 2002. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Progress in Hormone Research* 57:357-384.
58. Meneses A. 2003. A pharmacological analysis of an associative learning task 5HT_{1A} 5HT₇ receptor subtypes function on a Pavlovian instrumental autoshaped memory. *Serotonin and memory review*, 10: 363-372.
59. Miasnikov Alexandre A., Chen Jemmy C., and Weinberger Norman M. 2008. Specific Auditory Memory Induced by Nucleus Basalis Stimulation Depends on Intrinsic Acetylcholine. *Neurobiology of Learning and Memory* 90. 443–454
60. Montero Pastor Ana. Efectos de la estimulación eléctrica del Núcleo Basal Magnocelular sobre el condicionamiento de evitación activa de dos sentidos en ratas. Tesis doctoral.
61. Moore Nicole L., Narayanana Ramesh, and Weigel Nancy L. 2007. Cyclin dependent kinase 2 and the regulation of human progesterone receptor activity. *Steroids*. 72(2): 202–209.
62. Morgan DO. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature*. Mar 9; 374(6518):131-4.
63. Morgan David. 2007. “The cell-cycle control system” En: *The cell cycle: Principles of control*. Chapter 3. *Primers in Biology*. p.172
64. Narayanan Ramesh, Edwards Dean P. and Weigel Nancy L. 2005. Human Progesterone Receptor Displays Cell Cycle-Dependent Changes in Transcriptional Activity. *Molecular and cellular biology*, Apr. p. 2885–2898 Vol. 25, No. 8-
65. Navarrete F., Pérez Ortíz JM., Femenía T., García Gutiérrez MS., García Payá ME., Leiva Santana C., Manzanares J (2008). Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Review neurology*; 47:137-145.
66. Nilsen Jon and Diaz Brinton Roberta. 2002. Impact of Progestins on Estrogen-Induced Neuroprotection: Synergy by Progesterone and 19-

Norprogesterone and Antagonism by Medroxyprogesterone Acetate. *Endocrinology* 143 (1): 205

67. Nikolic M, Dudek H, Kwon Y T. 1996. The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev.* 10: 816-825.
68. Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA2-2002, Prevención y control de enfermedades en la perimenopausia y postmenopausia de la mujer. Criterios para brindar la atención médica. 8 de marzo de 2001. *Diario Oficial de la Federación.*
69. Paganini-Hill A. and Henderson V.W. 1994. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J. Epidemiol.* 140:256-261.
70. Parent Marise B. and Baxter Mark G. 2004. Septohippocampal Acetylcholine: Involved in but not Necessary for Learning and Memory? *Learn. Mem.* 2004. 11: 9-20.
71. Pestell Richard g., Albanese Chris, Reutens Anne T., Segall Seffrey E., Lee Richard J., and Arnold Andrew. 1999. The Cyclins and Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Hormonal Regulation of Proliferation and Differentiation. *Endocrine Reviews* 20(4): 501–534.
72. Picazo O., Fernfindez-Guasti A. 1995. Anti-anxiety effects of progesterone and some of its reduced metabolites: an evaluation using the burying behavior test. *Brain Research* 680 (1995) 135-141.
73. Prieto A, O, Villamar-Cruz, M Saqui-Salces, T Neri Gómez, A Almaraz-Nieves, V. I. Hernández Molina, H Valdez Rodríguez, I. Camacho Arroyo (2003). Como actúan las hormonas. *Educación Química* 14: 196-201.
74. Reddy Doodipala S., O'Malley Bert W., Rogawski Michael A. 2005. *Neuropharmacology* 48: 14–24.
75. Rocca Walter A., Grossardt Brandon R, Shuster Lynne T. Oophorectomy, Menopause, Estrogen, and Cognitive Aging: The Timing Hypothesis. 2009. *Neurodegenerative disease.* 259T1
76. Sato Shinji, Xu Jiqing, Okuyama Satoshi, Martinez Lindsey B., Walsh Shannon M., Jacobsen Michael T., Swan Russell J., Schlautman Joshua D., Ciborowski Pawel, and Ikezu Tsuneya. 2008. Neurobiology of Disease Spatial Learning Impairment, Enhanced CDK5/p35 Activity,

and Downregulation of NMDA Receptor Expression in Transgenic Mice Expressing Tau-Tubulin Kinase 1. *The Journal of Neuroscience*, 28(53):14511–14521.

77. Scott James R, Danforth David Newton. *Tratado de obstetricia y ginecología*. 8a Ed. McGraw-Hill, (2005). (1168 pp)
78. Sherwin Barbara (2005). Surgical Menopause, Estrogen, and Cognitive Function in Women: What Do the Findings Tell Us? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1052: 3–10.
79. Simpkins James W., Green; Gridley, Singh, De Fiebre, Rajakumar (1997). Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's Disease. *The American Journal of Medicine* 103 (3), 1.
80. Simoncini Tommaso and Genazzani Andrea R. 2003. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *European Journal of Endocrinology* 148 281–292.
81. Smith Deanna S, Greer Paul L., and Tsai Li-Huei. 2001. Cdk5 on the Brain. *Cell Growth & Differentiation Vol. 12*, 277–283.
82. Singh M., Meyer, E.M., Millard, W.J., Simpkins, JW. (1994). Ovarian steroid deprivation results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female Sprague-Dawley rats. *Brain Res.* 644:305-312.
83. Singh Meharvan. 2005. Mechanisms of Progesterone-Induced Neuroprotection. *Academy of Sciences.* 1052: 145–151. New York.
84. Singh Meharvan. 2006. Progesterone-Induced Neuroprotection. *Endocrine*, vol. 29, no. 2, 271–274.
85. Singh Meharvan, James A. Dykens, and James W. Simpkins. 2006. Novel Mechanisms for Estrogen-Induced Neuroprotection. *Exp. Biol. Med.* 231:514-521.
86. Smith, G.R., Betancourt, L., Sun Yuxiang. (2005). Molecular endocrinology and physiology of the aging central nervous system. *Endocr Rev.* 26: 203-250.

87. Rukhsana Sultana D. 2007. Allan Butterfield. Regional expression of key cell cycle proteins in brain of subjects with amnesic mild cognitive impairment. *Neurochem Res.* 32: 655-662.
88. The Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. The Journalist's Menopause Handbook, febrero, 2006. A companion guide to the society of obstetricians and gynaecologist of Canada menopause consensus report.
89. Toran-Allerand, C.D., Singh, M, Setalo, G.Jr. (1999). Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol.* 20: 97-121
90. Toran-Allerand CD., Tinnicov AA., Singh RJ., Nethrapalli IS. 2005. 17alpha estradiol: a brain active-estrogen? *Endocrinology.* 146(9) 3843-50.
91. Vearncombe Katharine J., BPsychSci, Hons, Pachana Nancy (2009). Is connective function detrimentally affected after early induced menopause? *Journal of North American Menopause Society.* 16(1): 188-198.
92. Villarroya-Pastor T (2001). Perfil de la Enfermedad de Alzheimer en las mujeres. *Review Neurology;* 32: 1178-1181.
93. Volosin Marta, Song Wenyu, Almeida Ramiro D, Kaplan David R., Hempstead Barbara, Friedman Wilma (2006). Interaction on survival and death Signalin in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *Journal Neurosci;* 26(29): 7756-7766.
94. Warnock Geoff, Prickaerts Jos and Thomas Steckler. 2006. Neurotransmitter Interactions and Cognitive Function. En: *Interactions between CRF and acetylcholine in the modulation of cognitive behavior.* Edited by Edward D. Levi.
95. Weishaupt J. H. Neusch C. M. Böhr. 2003. Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and neuronal cell death *Cell Tissue Res* 312:1–8.
96. Wen Yi, Yang Shaohua, Liu Ran, Brun-Zinkernagel Anne Marie, Koulen Peter and James W. Simpkins. 2004. Transient Cerebral Ischemia Induces Aberrant Neuronal Cell Cycle Re-entry and Alzheimer's Disease-like Tauopathy in Female Rats. *The journal of biological chemistry* Vol. 279, No. 21. pp. 22684–22692, 2004

97. Wise Phyllis M., Dubal Dena B., Wilson Melinda E., Rau Shane W., and Böttner Martina, Minireview: Neuroprotective Effects of Estrogen—New Insights into Mechanisms of Action. *Endocrinology*, 2001
98. Williams Mark J and Adinoff Bryon. 2008. The Role of Acetylcholine in Cocaine Addiction. *Neuropsychopharmacology*. 33, 1779–1797
99. Wu Jie, Yiqing Zhu, Wu Jing. 2008. Effects of estrogen and estrogenic compounds on cognition in ovariectomized rats. *Climacteric* 11: 212-220.
100. Yaffe Kristine; Sawaya George; Lieberburg Ivan; Grady Deborah. 1998. Estrogen Therapy in Postmenopausal Women Effects on Cognitive Function and Dementia. *JAMA*. 279(9):688-695.
101. Zhang Jie, Li Huifang, and Herrup Karl 2010. Cdk5 Nuclear Localization Is p27-dependent in Nerve Cells implications for cell cycle suppression and caspase-3 activation. *The journal of biological chemistry* vol. 285, No. 18, pp. 14052–14061.
102. Zhao Liqin and Diaz Brinton Roberta. 2006. Select estrogens within the complex formulation of conjugated equine estrogens (Premarin®) are protective against neurodegenerative insults: implications for a composition of estrogen therapy to promote neuronal function and prevent Alzheimer's disease. *BMC Neuroscience*, 7:24
103. Zheng Ya-Li, Kesavapany Sashi,^{1,3} Gravell Maneth, Hamilton, Rebecca S, Schubert Manfred, Amin Niranjana, Albers Wayne, Grant Philip and Pant Harish C. 2005. A Cdk5 inhibitory peptide reduces tau hyperphosphorylation and apoptosis in neurons. *The EMBO Journal* 24, 209–220.

APÉNDICE I “SOLUCIONES PARA INMUNOBLOT”

- RECOLECCIÓN DE MUESTRAS: Las muestras se congelan con N₂ líquido por inmersión en un eppendorf y se congelan a -70°C hasta su uso.
(* No congelar-descongelar ya que se pierden proteínas)
- HOMOGENEIZACIÓN: Se homogeniza la muestra en un tubo de ensayo de 2ml con 200µl de buffer de Homogeneización (PIK + inhibidores de proteasas.)

* PIK (200ml)

1)

- 150mM NaCl	1,75 g
- 20mM Tris HCl	0.485g
- 5mM EDTA	2 ml stock 0,5M

2) Medir pH 7,4

3)

- 10% Glicerol	20 ml
- NP 40 1%	2 ml

Inhibidores de proteasas

- Aprotinina 225mg/mL	} 1:1000
- Leupeptina 4mg/mL	
- PMSF 1mM	
- Ortoanadato 1mM	

Las muestras se homogenizan durante 15-30'' en el tubo de ensayo metido en un falcon con hielo. La muestra debe quedar homogénea y sin burbujas. Una vez conseguido se vuelve la muestra al mismo eppendorf con una pipeta Pasteur.

- Centrifugar 10´a 10000 rpm a 4°C (en la cámara fría)
- Recoger el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el sedimento.

(*) Las muestras se guardan a 4°C en hielo mientras se hace la cuantificación de proteínas. Si se va a tardar un par de días en utilizarlas, se hacen alícuotas de la muestra de 15µl y se congelan a -20°C.

➤ CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

- Curva patrón de albumina bovina sérica (BSA): La solución stock de BSA debe ser de 20 µg/ml.
- Se pesan 20mg de BSA en 1ml de H₂O (o equivalente para conseguir concentración de 20 mg/ml * 9,3mg de BSA en 0,465ml de H₂O). Tomar 10µl y diluirlos en 10ml de H₂O para conseguir una concentración de 20 µg/ml. Dejar esta solución un tiempo agitándose pues tarda en ser homogénea.
- Hacemos una curva patrón de BSA utilizando diferentes concentraciones (0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20), cada una de ellas por triplicado.

	Solución stock (µl)	H ₂ O(µl)
0	-	200
1	10	190
2,5	25	175
5	50	150
7,5	75	125
10	100	100
15	150	50
20	200	-

Las muestras se cuantificaron por triplicado, tomando 1µl de muestra 1:3 (en eppendorf de 0,5 ml 10µl de H₂O y 5 µl de la muestra); de cada una se tomó 2µl 3 veces) en 758µl de H₂O.

- Añadir a todos los pocillos 200µl de colorante Bradford (BioRad) sin diluir.
- Leer a los 5´-30´ a 595nm

Obtuvimos 3 valores (µg/ml) por cada muestra y se hace la media para calcular los µl para obtener la concentración de 50µg de proteína total.

- PREPARACIÓN DEL GEL: El gel tiene dos partes: Stacking (concentrador) y Resolving (separador) que polimerizan en caliente por lo que hay que guardarlo en frío hasta su utilización.

RESOLVING (100ml)

Tamaño de la proteína (Kda)	14	15-70	20-100	50-250	>250
Gel	14%	12%	10%	8%	7%
Glicerol 50%	20	20	20	20	20
H ₂ O	8.33	15	21.68	28.33	31.66
Tris 1,5M ph 8,8*	25	25	25	25	25
acril-bis***	46.66	40	33.32	26.66	23.33
SDS 10%#	1	1	1	1	1

STACKING (100 ml)

Glicerol 50%	-
H ₂ O	61
Tris 0,5M ph 6,8**	25

acril-bis***	13
SDS 10%#	1

*Tris 1,5M pH 8,8 (200 mL): 12 gr Tris base + H₂O, ajustar pH con HCl y llevar a 200mL

** Tris 0,5M ph 6,8 (200mL): 36,3gr Tris Hcl + H₂O, ajustar pH y llevar a 200mL

*** *acrilamida-bisacrilamida*: Stock al 30%. (proporción 37,5:1). 250ml: 73 gr acrilamida + 2 gr bisacrilamida + 175ml H₂O

Tanto al stacking como al resolving hay que agregar agentes polimerizantes. El persulfato de amonio (APS) al 10 %.

Resolving (15ml): AP 100µl

TEMED 5µl

Stacking (6ml): AP 60µL

TEMED 5µl

BUFFER DE CARGA solución stock 2X (10mL)

Tris base 50mM	2.4mL
Glicerol 10%	2mL
Azul de bromofenol 10%	1mL
H ₂ O	4.8mL

Para 1mL tomar:

Solución stock	700µL
SDS	250µL
β mercaptoetanol	50µL

BUFFER DE CORRIDA 10X

Tris base 25mM	30.2g
Glicina 192mM	114.1g
SDS 0.1%	100mL

BUFFER DE TRANSFERENCIA 1x

Tris base 25mM 5.82g

Glicina 192mM 2.93g

SDS 0.1% 0.375g

Resuspender en 800mL de H₂O. Aforar a un litro con 200mL de metanol y conservar a 4°C.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRAS:

- Cada pozo de la cámara de electroforesis se carga con 50µg de proteína. Aquellos carriles con muestra llevarán la cantidad calculada para 50µg + su respectiva cantidad de buffer de carga.
- Antes de cargar hay que desnaturalizar las proteínas. Hervir 5' los eppendorf cerrados.
- Centrifugar 1' a 14000 rpm
- Cargar muestras y marcador de peso molecular (5µl Biorad precision plus- Llenar cámara con buffer de carga y montar con los cristales.

La electroforesis se desarrolla a 75V durante 2 horas y media a temperatura ambiente.

➤ TRANSFERENCIA

- Rotular membranas
- 1L buffer de transferencia 1X con 20% metanol
- 1 papel Watmann
- Separo cristales.
- Quitar stacking y separar el gel de los cristales.
- Poner el Watmann encima y colocar el gel sobre él.
- Poner membrana nitrocelulosa, los dos Watmann y la esponja.
- Quitar burbujas con rodillo y cerrar cassette.
- Transferir a 260 mA, 2h a temperatura ambiente 1 hora. Las proteínas migran del cátodo al ánodo.