



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**“La proteína tau hiperfosforilada remodela la morfología y actividad del
hipocampo en el modelo transgénico de tauopatías rTg4510”**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.B.C. Carlos Antonio García Carlos

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez
Instituto de Neurobiología UNAM Campus Juriquilla

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez
Universidad Autónoma de Querétaro
Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda
Instituto de Neurobiología UNAM Campus Juriquilla

Cd. Mx. Octubre, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Los miembros del comité tutorial certificamos que la tesis elaborada por: *Carlos Antonio García Carlos*, cuyo título es: *La proteína tau hiperfosforilada remodela la morfología y actividad del hipocampo en el modelo transgénico de tauopatías rTg4510* se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente: Victor Hugo de Lafuente Flores _____

Secretario: Siddhartha Mondragón Rodríguez _____

Vocal: Maria del Carmen Cárdenas Aguayo _____

Suplente: Sofía Yolanda Díaz Miranda _____

Suplente: Luis Alberto Carrillo Reid _____

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente proyecto fue realizado en el Laboratorio C-01 de Circuitos Neuronales, a cargo del Dr. Fernando Peña Ortega, en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez.

Este proyecto fue financiado por CONACYT a través del proyecto 269021 y 319863 (Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez) y por el programa de Cátedras Conacyt para Jóvenes Investigadores.

A la Universidad Nacional Autónoma de México-UNAM y al Instituto de Neurobiología-UNAM (INB). Campus Juriquilla, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación profesional a través del Programa de Posgrados (Programa de Maestría en Ciencias en Neurobiología). Así como del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para la asistencia a congreso.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) No. De Becario: 778867, por otorgarme una beca nacional que ha sido un gran apoyo para lograr la culminación del programa de posgrado.

Al MVZ. José Martín García Servín, a la Dra. Alejandra Castilla León, Dra. María A. Carbajo Mata y al personal que labora dentro del Laboratorio Universitario de Bioterio por el apoyo en el alojamiento y cuidado de los ratones empleados en este proyecto.

A la Dra. Sofía Y. Díaz Miranda por brindarme el espacio, materiales y a la Técnico Académico, la M en C. Azucena Aguilar Vázquez por su apoyo necesario para las técnicas histológicas.

A la Dra. Erika M. Orta Salazar por la asesoría y soporte técnico.

A la Ing. Nydia Hernández Ríos por la facilitación y asesoría en el área de microscopía.

Al Dr. Benito Ordaz, por el apoyo técnico y asesorías en el cuidado de los ratones utilizados para este proyecto.

A la Dra. Nuri Aranda López de la Unidad de Enseñanza por el apoyo administrativo durante el desarrollo de la maestría.

A los miembros de mi comité tutor, Dra. Sofía Y. Díaz Miranda y el Dr. Carlos Saldaña por la asesoría, apoyo y comentarios en la realización de este proyecto de tesis.

A mi tutor académico el Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez, por la oportunidad de trabajar con él y su asesoría en el desarrollo de este proyecto.

DEDICATORIAS

*A mis amigos, papás y hermano
A ti Marina, el primero de muchos pasos juntos*

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	3
ÍNDICE DE FIGURAS	8
APENDICE	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1 Enfermedad de Alzheimer	14
2.2 Mecanismos moleculares	15
2.3 Zonas del tejido cerebral afectadas durante la EA	16
2.4 Proteína tau	20
2.5 Proteína Amiloide beta.....	23
2.6 Herramientas de diagnóstico	25
2.7 Biomarcadores.....	26
2.8 Actividad cerebral	27
2.9 Opciones terapéuticas basadas en tau y A β	30
2.10 Modelos Animales	31
3. JUSTIFICACION	34
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	35
5.1 Objetivo General.....	35
5.2 Objetivos Particulares	35
6. METODOLOGÍA.....	36
6.1 Modelos animales.....	36

6.2 Registros electrofisiológicos	36
6.3 Análisis de registros electrofisiológicos.....	37
6.4 Inmunofluorescencia y caracterización por microscopía.....	37
6.5 Análisis morfológico	38
6.6 Densitometría celular	38
7. RESULTADOS	39
7.1 La actividad oscilatoria en hipocampo de ratones jóvenes rTg4510.....	39
7.2 Neuronas del modelo rTg4510 joven muestran acumulación intracelular de ptau.....	40
7.3 No se detectan alteraciones estructurales en el hipocampo en modelo rTg4510 joven.....	43
7.4 Morfología hipocampal en el modelo joven rTg4510	45
8. DISCUSIÓN	46
9. ANEXOS	51
10. LOGROS ACADÉMICOS	52
a. Anexo I.....	53
b. Anexo II.....	68
c. Anexo III.....	69
d. Anexo IV.....	70
11. LITERATURA CITADA.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia (en millones) de personas con patología tipo Alzheimer a nivel mundial en los años 2006-2050	15
Figura 2. Patrones de distribución de los cambios neurofibrilares en la EA.	19
Figura 3. Relaciones anatómicas y funcionales claves de la corteza retrosplenial	20
Figura 4. Secuencia de tau subdividida en dos dominios activos.....	22
Figura 5. Vías de escisión de la proteína precursora amiloidea (PPA).....	24
Figura 6. La actividad oscilatoria está alterada en el hipocampo de ratones jóvenes rTg4510.....	40
Figura 7. ptau intracelular en neuronas del hipocampo y corteza del modelo joven rTg4510.	42
Figura 8. ptau intracelular en neuronas del hipocampo y corteza del modelo joven rTg4510.....	43
Figura 9. No hay alteraciones estructurales en el modelo rTg4510 joven.	44
Figura 10. Análisis morfológico del hipocampo en los modelos rTg4510 y No-Tg.	46
Figura A1. Espectros de potencia relativa.....	49

APENDICE

Abreviaturas

- **ptau** Proteína tau Hiperfosforilada
- **PA β** Placa de amiloide beta
- **MBD** Dominio de Unión a Microtúbulos
- **EA** Enfermedad de Alzheimer
- **MNF** Marañas Neurofibrilares
- **Sub** Subículum
- **EC** Corteza Entorrinal
- **GD** Giro Dentado
- **GSK-3 β** Glicógeno Sintasa
- **rNMDA** Receptor N-metil-D-aspartato
- **AMPA** α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
- **LTP** Potenciación a largo plazo
- **LTD** Depresión a largo plazo
- **PSD-95** Densidad Postsináptica 95
- **PBS** Buffer salino de fosfatos
- **LFP** Potencial local de campo

RESUMEN

La hiperfosforilación de la proteína tau en varios sitios (ptau), incluidos los cercanos a su dominio de microtúbulos (MBD), se considera un evento patológico clave en el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer (EA). Sin embargo, recientemente demostramos que, en la etapa muy temprana de la EA, ptau promueve neuroprotección al prevenir la actividad eléctrica de tipo epiléptica. En el presente trabajo se evaluó el impacto de ptau en el modelo de ratón transgénico rTg4510 de un mes de edad (p30-35). Los resultados evidenciaron que las neuronas del hipocampo de los ratones rTg4510 a los p30-35 de edad, acumulan proteína ptau y esto se correlaciona con cambios en la actividad oscilatoria del hipocampo. Además, encontramos una reducción significativa en el área somática de las neuronas piramidales y granulares ptau positivas en estos ratones jóvenes rTg4510. A pesar de esto, se encontró anatómicamente, un mayor número de dendritas por célula en las neuronas granulares. En resumen, este estudio proporciona evidencia de que ptau remodela la función y la morfología del hipocampo.

ABSTRACT

Tau hyperphosphorylation at several sites, including those close to its microtubule domain (MD), is considered a key pathogenic event in the development of Alzheimer's disease (AD). Nevertheless, we recently demonstrated that at the very early disease stage, tau phosphorylation (ptau) at MD sites promotes neuroprotection by preventing seizure-like activity. To further support the notion that very early ptau is not detrimental, the present work evaluated the impact of ptau in the young rTg4510. Our results showed that at this very early stage the hippocampal neurons from p30-35 rTg4510 mice accumulate ptau protein and exhibit frequency reduction in hippocampal oscillatory activity. Moreover, we found a significant reduction in the somatic area of ptau positive pyramidal and granule neurons in the young rTg4510 mice. Despite this, increased number of dendrites per cell in granule neurons was found. Altogether, this study provides further evidence that ptau remodels hippocampal function and morphology.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas son trastornos que se caracterizan principalmente por déficit cognitivo y disfunción de la memoria, siendo la Enfermedad de Alzheimer (EA) la más común (Mondragón-Rodríguez et al., 2012; 2019; 2020; Gaugler et al., 2016; Weller et al., 2018). Son un problema de salud a nivel mundial y afectan principalmente a la población adulta mayor (Gaugler et al., 2016; Erkinen et al., 2018; Weller et al., 2018). La hipótesis actual postula que, debido a una acumulación extracelular de proteína amiloide beta ($A\beta$) y una acumulación intracelular de la proteína tau anormalmente fosforilada (ptau), se produce la disfunción sináptica y la muerte celular (Selkoe, 2002; Mondragón-Rodríguez et al., 2012; 2017; 2020; Selkoe et al., 2016; Chen et al., 2019). Estudios en humanos y en modelos animales (modelos transgénicos), han revelado una interacción directa de los péptidos $A\beta$ y la proteína ptau como causantes de toxicidad durante el desarrollo de la EA (Hardy et al., 2002; Ittner et al., 2011). Como potencial mecanismo, se ha propuesto que las especies tóxicas de $A\beta$ modulan proteínas quinasas y fosfatasas que incrementan la fosforilación de tau, induciendo su agregación y plegamiento anormal (Ittner et al., 2011; Bloom 2014). En este contexto, se ha propuesto que las formas tóxicas de la proteína ptau median la disfunción sináptica y muerte neuronal que lleva a defectos cognitivos y de memoria que se observa en la EA (Bloom 2014). Así mismo, mediante el uso de modelos transgénicos se ha reportado que la acumulación de ptau es suficiente para alterar la actividad de los circuitos neuronales, alteración detectada en los potenciales de campo (LFP) (Tanninen et al., 2017). Adicionalmente, se ha reportado que la agregación de ptau es capaz de alterar la actividad eléctrica de tipo oscilatorio (Ahnaou et al., 2017) y reducir de manera significativa la actividad de la red neocortical (Menkes-Caspi et al., 2015).

De manera interesante, se ha observado que en etapas previas a la acumulación de estas proteínas (etapas iniciales o tempranas) ya se producen cambios a nivel de actividad neuronal (Mondragón-Rodríguez et al., 2018). Recientemente nuestro grupo de investigación reportó un aumento en los niveles de la proteína ptau en

neuronas piramidales e interneuronas parvalbúmina positivas (PV+) hipocámpales de un modelo triple transgénico (3xTgAD) de 5 semanas de edad (Mondragón-Rodríguez et al., 2018). Adicionalmente, el incremento de ptau en el hipocampo se correlacionó con alteraciones en la actividad oscilatoria generada en el hipocampo (Mondragón-Rodríguez et al., 2018). Cabe mencionar que actualmente las enfermedades neurodegenerativas solo pueden ser diagnosticadas en etapas de desarrollo muy avanzadas, es decir, cuando el tejido presenta un estado de neurodegeneración muy avanzado (Brookmeyer et al., 2007; Serrano-Pozo et al., 2011). En este sentido, potenciales alteraciones a nivel de actividad eléctrica se postulan como nuevos biomarcadores para la detección preclínica de estas patologías.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por cambios histopatológicos en el tejido cerebral, tales como la pérdida neuronal y el deterioro en la transmisión sináptica (Selkoe, 2002; Mondragón-Rodríguez et al., 2012; Selkoe et al., 2016; Chen et al., 2019; Ahnaou et al., 2020). Estas alteraciones se traducen en déficits cognitivos como deterioro gradual de la memoria y posteriormente problemas de comunicación, desorientación, confusión, cambios de comportamiento y en última instancia, dificultad para hablar, tragar y caminar (Physicians, 2020). Los factores de riesgo que inciden en esta cohorte son en orden decreciente de importancia: deterioro funcional instrumental preexistente, diabetes (síndrome metabólico), deterioro sensorial (auditivo y/o visual), depresión, edad y sexo femenino (Instituto Nacional de Geriátría <http://www.geriatria.salud.gob.mx/>).

Actualmente, la EA es la causa de demencia más común en el mundo y representa aproximadamente el 80% de casos de demencia, afectando a un aproximado de 24 millones de personas en el mundo (Gaugler et al., 2016; Erkinen et al., 2018; Weller et al., 2018; Physicians, 2020). En México existen más de 13 millones de adultos mayores de 60 años, con propensión a desarrollar demencia, amenaza importante para su calidad de vida y su autonomía (Instituto Nacional de Geriátría <http://www.geriatria.salud.gob.mx/>). Durante el curso de la enfermedad el nivel de atención requerido para un paciente puede variar desde la atención diurna para adultos en la etapa temprana de la enfermedad clínica hasta la atención intensiva en un hogar de ancianos en la etapa tardía de la enfermedad, donde alrededor del 42% de casos de EA necesitan de este último nivel (Brookmeyer et al., 2018). Las tasas de mortalidad entre las personas con EA son más altas que los de la población general (Brookmeyer et al., 2018). Desde el momento inicial en que la EA es diagnosticada, dura aproximadamente de 8 a 10 años hasta el momento de la muerte, con una supervivencia media de 8 años

(Neil, 2009). Se estima que para el año 2050 el número de pacientes con EA se verá cuadruplicado (Figura 1) (Brookmeyer et al., 2007), donde la proyección del número de mexicanos afectados por la EA alcanzará la cifra de más de 3.5 millones, por lo que el impacto en el sistema de salud será severo (Instituto Nacional de Geriátrica <http://www.geriatria.salud.gob.mx/>). Así mismo, en Estados Unidos se reporta un estimado de 6.5 millones de personas de 65 años o más con EA (Physicians, 2022). El porcentaje de personas con EA incrementa con la edad: 27% de los pacientes tienen 65-74 años, 37.2% de pacientes 75-84 años y 35.7% tienen 85 años o más (Gaugler et al., 2016; Weller et al., 2018; Physicians, 2022). Las personas menores de 65 años también pueden desarrollarla, pero es menos común y aún no se conoce su prevalencia (Erkinen et al., 2018; Physicians, 2022). Según la Asociación de Alzheimer, se estima que el costo total de estos pacientes en 2022 sea de 321 mil millones de dólares (Physicians, 2022).

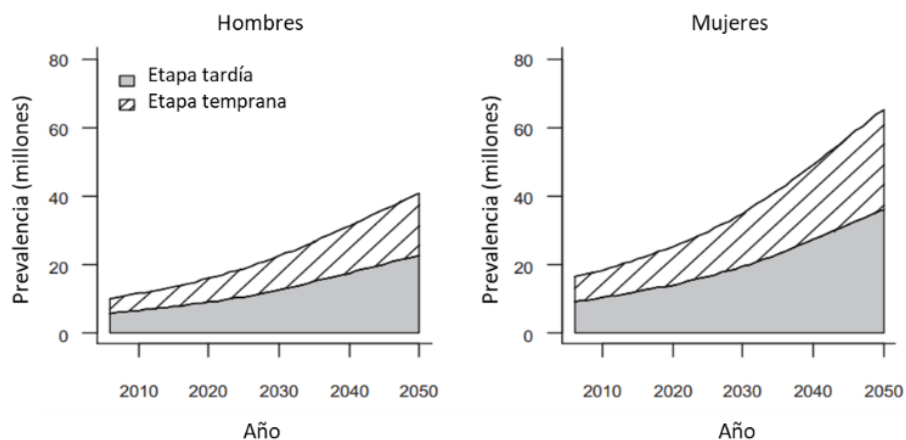


Figura 1. Prevalencia (en millones) de personas con patología tipo Alzheimer a nivel mundial en los años 2006-2050 (Modificado de Brookmeyer et al., 2007).

2.2 Mecanismos moleculares

Son dos las proteínas de enfoque principal en la investigación del desarrollo de la EA, tau anormalmente fosforilada (ptau) y amiloide beta ($A\beta$) (Mondragón-

Rodríguez et al., 2012; 2017; Iqbal et al., 2016; Erkinen et al., 2018; Morris et al., 2018). Los síntomas de la enfermedad se correlacionan con la presencia de estas dos proteínas en su forma agregada: placas amiloides (PA β) constituidas por proteínas A β y Marañas Neurofibrilares (MNFs) constituidas principalmente por proteínas ptau (Mondragón-Rodríguez et al., 2017; Rajmohan et al., 2017). Ambas lesiones aparecen en cerebros de pacientes con patologías de tipo neurodegenerativo a medida que las patologías avanzan (Braak et al., 1991; Mondragón-Rodríguez et al., 2008; 2014).

La hipótesis con mayor aceptación de cómo se produce la EA postula que debido a un incremento de A β extracelular, tau incrementa sus niveles de fosforilación de manera anormal lo que genera que se disocie de los microtúbulos y se agregue en las MNFs, provocando disfunción neuronal y muerte celular (Mandelkow et al., 1995, 2007; Kandimalla et al., 2018; Mondragón-Rodríguez et al., 2020). Antes de la formación de estos agregados ya se observan cambios tanto a nivel cognitivo como de actividad neuronal (Rajmohan et al., 2017; Basurto-Islas et al., 2008a; Mondragón-Rodríguez et al., 2018; 2019; 2020). En este sentido, una hipótesis reciente sustenta que, durante etapas tempranas o iniciales de la neurodegeneración, los incrementos en los niveles de ptau modifican la respuesta sináptica mediada por receptores de N-Metil-D-Aspartato (nNMDA), lo que se traduce en alteraciones de la actividad neuronal y posteriormente en alteraciones a nivel cognitivo (Mondragón-Rodríguez et al., 2012; 2013, 2017, 2018; 2020).

2.3 Zonas del tejido cerebral afectadas durante la EA

Las personas que cursan con la EA sufren de cambios patológicos en el cerebro que se caracterizan por la aparición de lesiones extracelulares (PA β) y lesiones intracelulares (MNFs) (Basurto-Islas et al., 2008a; Mondragón-Rodríguez et al., 2012; 2017; 2018 Sevigny et al., 2016). La acumulación de este material histopatológico comienza antes de la aparición de los síntomas clínicos (fase preclínica) y durante etapas avanzadas de la patología las lesiones aparecen en

prácticamente todo el tejido cerebral (Braak et al., 1991; Basurto-Islas et al., 2008b; Kolarova et al., 2012).

Se ha observado que los cambios neuropatológicos en la EA se manifiestan inicialmente en la corteza entorrinal (CE), y de manera progresiva hacia el hipocampo, con una participación creciente del neocórtex a medida que avanza la enfermedad (Braak et al., 1991; Neil, 2009; Serrano-Pozo et al., 2011). Una patología neocortical significativa ya está presente en el momento que clínicamente la demencia se diagnostica, lo que ha impulsado esfuerzos para identificar las manifestaciones clínicas de la EA en sus primeras etapas, es decir, cuando los cambios patológicos se restringen a las estructuras del lóbulo temporal medial (Neil, 2009). Si bien es cierto, que durante las etapas iniciales e intermedias de la patología se puede detectar una atrofia generalizada de la corteza cerebral, una inspección más cercana de los lóbulos temporales puede revelar un mayor grado de atrofia que afecta la amígdala, el hipocampo y la circunvolución parahipocampal (Neil, 2009).

En el cerebro humano, la participación progresiva de múltiples dominios cognitivos de la EA refleja la acumulación de cambios patológicos en los lóbulos frontal, temporal y parietal; aunque los lóbulos occipitales se conservan sin alteración en las primeras etapas de la EA (Neil, 2009). Las PA β son uno de los primeros cambios que se ven en el cerebro y preceden la aparición de las MNFs (Braak et al., 1991; Neil, 2009). Las primeras neuronas que exhiben MNFs son las neuronas de proyección pre-alfa en la corteza transentorrinal, una zona de transición entre la corteza entorrinal y la isocorteza adyacente (Braak et al., 1991; Vann, Aggleton and Maguire, 2009). Otras áreas con desarrollo temprano de MNFs son la CE y el área CA1 del hipocampo (Basurto-Islas et al., 2008b; Vann et al., 2009). En los estadios I y II (estadios transentorrinales) estos cambios patológicos menores se limitan a la CE e hipocampo. Los estadios III y IV (estadios límbicos) se caracterizan por un número moderado de MNFs en la corteza transentorrinal, CE y CA1, con números escasos adicionales de MNFs en CA4, el subículum y el parasubículum. También se encuentran pequeñas cantidades de MNFs en

cortezas de asociación. En los estadios V y VI (estadios isocorticales) todos los subcampos del hipocampo y las áreas de asociación isocortical se ven gravemente afectados (Figura 2) (Vann et al., 2009).

De manera interesante, en pacientes con EA la agregación de la proteína ptau se correlaciona más con el declive cognitivo y atrofia cerebral que la agregación de A β (Lewis et al., 1988; Skoog et al., 1995; Blennow et al., 1996; Cho et al., 2016; La Joie et al., 2020). Esto ya que la formación de las PA β no se ha relacionado con el grado de demencia, mientras que un mayor número de MNF en la corteza frontal se relaciona directamente con una mayor severidad de demencia (Blennow et al., 1996). Estudios recientes mediante la técnica de tomografía por emisión de positrones (PET), reportan que la detección de ptau tiene una mayor relación con el grado de neurodegeneración, así como deterioro estructural y funcional en etapas clínicas en comparación con la detección de A β (Cho et al., 2016; La Joie et al., 2020). Aunque se ha reportado que la acumulación de A β llega a su punto máximo en la fase preclínica de EA y no aumenta de manera significativa en las siguientes etapas de la enfermedad (Serrano-Pozo et al., 2011). Por el contrario, se ha reportado que la detección de tau fosforilada en el sitio Thr231 en el líquido cefalorraquídeo (LCR) funciona como un indicador del grado de degeneración axonal/neuronal (Skoog et al., 1995).

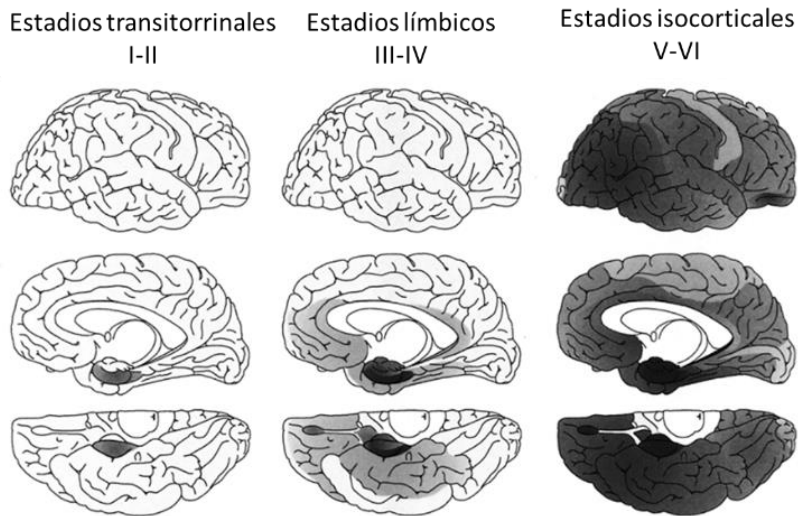


Figura 2. Patrones de distribución de los cambios neurofibrilares en la EA (Modificado de Vann, Aggleton and Maguire, 2009).

La corteza retrosplenial (CRE) es un área cortical que ha surgido como un miembro clave de una red central de regiones cerebrales porque sustenta una variedad de funciones cognitivas, incluida la memoria episódica, la navegación, la imaginación y la planificación para el futuro (Neil, 2009; Vann et al., 2009). Un trazado axonal en monos reveló conexiones recíprocas con tres regiones importantes: el hipocampo (subículum, presubículum y parasubículum), la región parahipocampal (corteza entorrinal, y áreas TH y TF) y núcleo talámico (núcleo dorsal anterior y lateral) (Figura 3), sugiriendo a la participación de la CRE en procesos dependientes del hipocampo (Rajmohan et al., 2017; Mondragón-Rodríguez et al., 2020). Las patologías en estas regiones, como ya se mencionó, han sido asociadas a síndromes amnésicos. Además, también se han observado conexiones de la CRE con la corteza prefrontal (Morris, 1996). Por ello, ahora también es evidente que la CRE está comprometida en los trastornos neurológicos más comunes que deterioran la memoria (Vann et al., 2009).

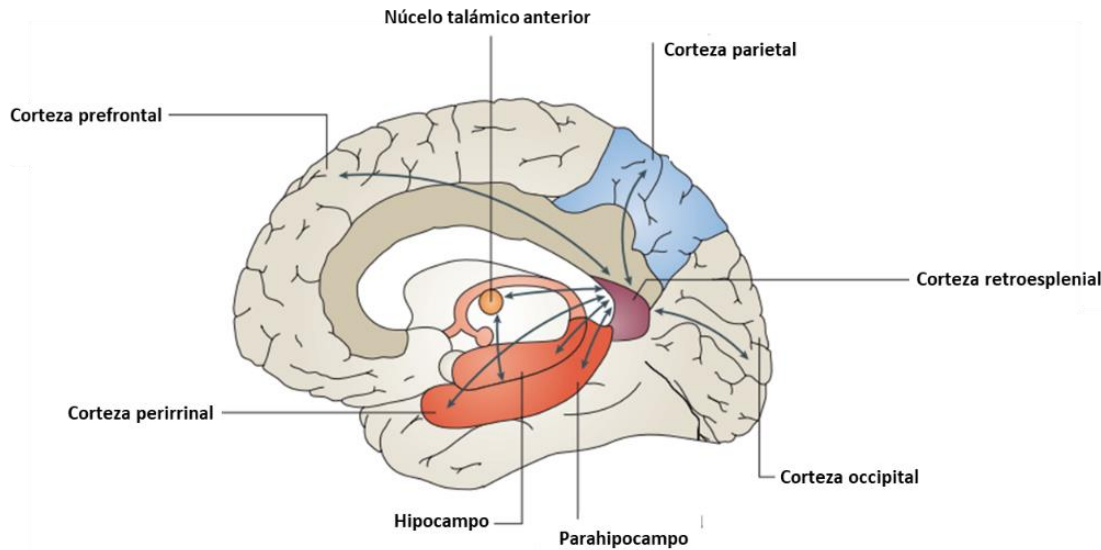


Figura 3. Relaciones anatómicas y funcionales claves de la corteza retrosplenial (Modificado de (Vann, Aggleton and Maguire, 2009).

2.4 Proteína tau

La proteína tau está codificada por el gen tau de la proteína asociado a microtúbulos, MAPT, que comprende 16 exones en el cromosoma 17q21 (Kolarova et al., 2012; Mietelska-Porowska et al., 2014; Wang et al., 2016). Se sabe que tau está distribuida en el soma y axones de las neuronas, sin embargo, se ha demostrado su presencia de manera fisiológica en las terminales dendríticas (Mondragón-Rodríguez et al., 2012). La proteína tau desempeña un papel muy importante en el ensamblaje de los monómeros de tubulina en microtúbulos mediante un segmento de dominio de microtúbulos (MBD), promoviendo la estabilización y regulando así la estructura y función adecuada de las neuronas (Mondragón-Rodríguez et al., 2012; Hervy et al., 2019; Tan et al., 2019). También se propone que tau participe en la transducción de señales, transporte de organelos, crecimiento celular (Wang et al., 2016a) y activación de receptores (Ittner et al., 2010a; Mondragón-Rodríguez et al., 2012). De manera interesante, se sugiere que la presencia de la proteína tau en dendritas pueda estar

relacionada a procesos de plasticidad sináptica (Frandemiche et al., 2014; Mondragón-Rodríguez et al., 2012; Ittner et al., 2018). Esto ya que se ha visto que la potenciación a largo plazo (LTP), proceso muy importante para la formación de la memoria, induce un incremento en los niveles posinápticos de la proteína tau (Frandemiche et al., 2014; Ittner et al., 2018).

La función de tau depende de su estado de fosforilación y la incorporación de grupos fosfato en tau depende del equilibrio entre las actividades de quinasas y fosfatasas (Mondragón-Rodríguez et al., 2012; Wang et al., 2016b). Tau tiene al menos 45 sitios de fosforilación, la mayoría de ellos en la región abundante en prolina (residuos 172-251) y en la región del carboxilo terminal (residuos 368-441) (Figura 4) (Mondragón-Rodríguez et al., 2008; 2012; 2014; 2018; Wang et al., 2016). La fosforilación de tau en estas dos regiones afecta su capacidad de interactuar con microtúbulos y proteínas sinápticas como la proteína de la densidad postsináptica 95 (PSD-95) y la tirosina quinasa 5 (Fyn) (Mondragón-Rodríguez et al., 2020). Adicionalmente, se ha propuesto que los agregados de MNFs son provocados por una hiperfosforilación anormal en diversos sitios de la proteína (Rajmohan et al., 2017).

En términos de la EA, los sitios de fosforilación localizadas en la región de C-terminal parecen provocar plegamiento anormal y escisión de proteínas, lo cual se ha propuesto lleva a la deposición de tau (Luna-Muñoz et al., 2007; Mondragón-Rodríguez et al., 2008; O'Brien et al., 2011). Adicionalmente, se han detectado fosforilaciones en los sitios Ser199/202/Thr205 y Ser396/404 en etapas tempranas y avanzadas de EA (Mondragón-Rodríguez et al., 2008; 2014). Así mismo, en pacientes con EA, niveles elevados de ptau (sitio Thr231) en LCR se han correlacionado con niveles elevados de atrofia hipocampal, lo que refleja un mayor nivel de daño neuronal y por tanto reducción de densidad hipocampal (Hempel et al., 2005).

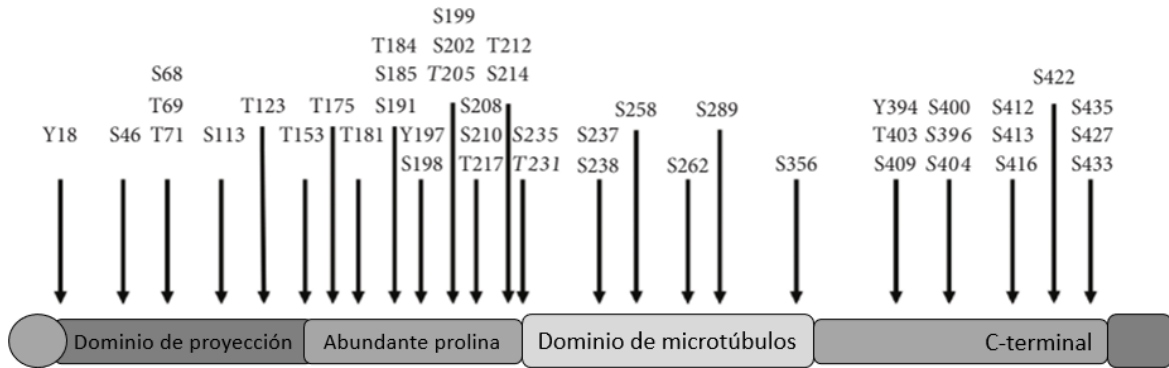


Figura 4. Secuencia de tau subdividida en dos dominios activos. La proteína tau tiene un dominio de unión a microtúbulos, una región media (Abundante en prolina que contiene múltiples patrones Thr-Pro, Ser-Pro) y finalmente, tiene una sección amino terminal (Modificado de Mondragón-Rodríguez et al., 2020b).

La formación de microtúbulos es un proceso dinámico de montaje y desmontaje que es crucial para el transporte axonal y para la comunicación neuronal, por lo tanto, una disrupción en este proceso debida a fosforilaciones anormales en tau puede llevar a una disfunción de transmisión sináptica y eventualmente a la muerte celular (Uchida et al., 1990; Medina et al., 2014; Wang et al., 2016b; Mondragón-Rodríguez et al., 2017; 2020b). Como previamente se mencionó, la hiperfosforilación y agregación de tau es controlada por su interacción con otras proteínas como A β , Pin1, PSD95, rNMDA y diversas quinasas como Fyn Quinasa y Glucógeno Sintasa Quinasa 3 β (GSK3 β) (Ittner et al., 2010; Mondragón-Rodríguez et al., 2017). En apoyo de su papel patológico, ptau se ha relacionado directamente con varios trastornos neurodegenerativos (tauopatías), como la EA, demencia frontotemporal, Síndrome de Down, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Pick (Ittner et al., 2010b; O'Brien et al., 2011; Mondragón-Rodríguez et al., 2008; 2014; 2017).

2.5 Proteína Amiloide beta

Como ya se mencionó, las PA β se consideran una de las principales causas de la EA (Zhang et al., 2007; Serrano-Pozo et al., 2011; Zhang et al., 2011; Mondragón-Rodríguez et al., 2017, 2018). Al contrario de las MNFs, las PA β son agregados extracelulares que se forman a partir del metabolismo de la proteína precursora amiloidea (PPA) (Zhang et al., 2007; 2011; O'Brien et al., 2011; Corbett et al., 2018). La PPA genera dos péptidos: A β 40 y A β 42 (40 y 42 aminoácidos respectivamente), siendo A β 42 la relacionada a la cascada tóxica que se propone contribuye al desarrollo de la EA (O'Brien et al., 2011). Pese a que no se conoce bien la función fisiológica de PPA, se ha visto que tiene efectos positivos en cultivos celulares modulando crecimiento celular, motilidad, crecimiento de neuritas y supervivencia celular (O'Brien et al., 2011).

El gen codificante para la PPA se localiza en el cromosoma 21 de los humanos, donde se pueden expresar 3 isoformas distintas: APP695 (expresada de manera predominante en el Sistema Nervioso Central), y las APP751 y APP750 (con 695, 751 y 750 aminoácidos respectivamente) (O'Brien et al., 2011; Corbett et al., 2018; Mondragón-Rodríguez et al., 2018). La PPA es una proteína transmembranal con un gran dominio extracelular N-terminal y un dominio intracelular corto C-terminal (Zhang et al., 2007; Corbett et al., 2018).

La escisión de PPA se da por las enzimas α , β y γ -secretasa mediante dos vías: amiloidogénica y no amiloidogénica (Figura 5) (O'Brien et al., 2011). La vía amiloidogénica de PPA ocurre por acción de la β -secretasa (BACE1) y γ -secretasa produciendo péptidos de A β de 42 aminoácidos de manera extracelular y fragmentos de C-terminal- β (FCT- β) de manera intracelular (O'Brien and Wong, 2011). De manera alterna, la PPA puede ser escindida por la α -secretasa para liberar PPA α soluble (sPPA α) que tiene efectos neuroprotectores y evita la generación de A β (O'Brien et al., 2011).

Aún no se sabe la razón de la acumulación de A β , pero podría relacionarse con cambios en el metabolismo de PPA o en los sistemas de eliminación de A β (Lisman et al., 2013; Goodman et al., 2018). Si bien el mecanismo que sigue A β

no está totalmente caracterizado se sabe que se acumula en la región postsináptica, uniéndose a rNMDA, desestabilizando la potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD) (Ittner et al., 2011). Se ha implicado que A β produce daño neuronal debido a una sobreexcitación de los rNMDA, generando excitotoxicidad mediada por glutamato (Ittner et al., 2011). La actividad de los rNMDA da como resultado una cascada de señalización que, bajo condiciones fisiológicas, contribuye a procesos neuronales adaptativos como LTP y fortalecimiento sináptico (Ittner et al., 2018). Sin embargo, la sobreexcitación de los rNMDA contribuye a señales tóxicas mediadas por entrada de niveles nocivos de calcio (Bloom 2014; Ittner et al., 2018). Esta excitotoxicidad impulsada por el calcio puede dañar los sitios postsinápticos y provocar la muerte de las neuronas (Bloom 2014).

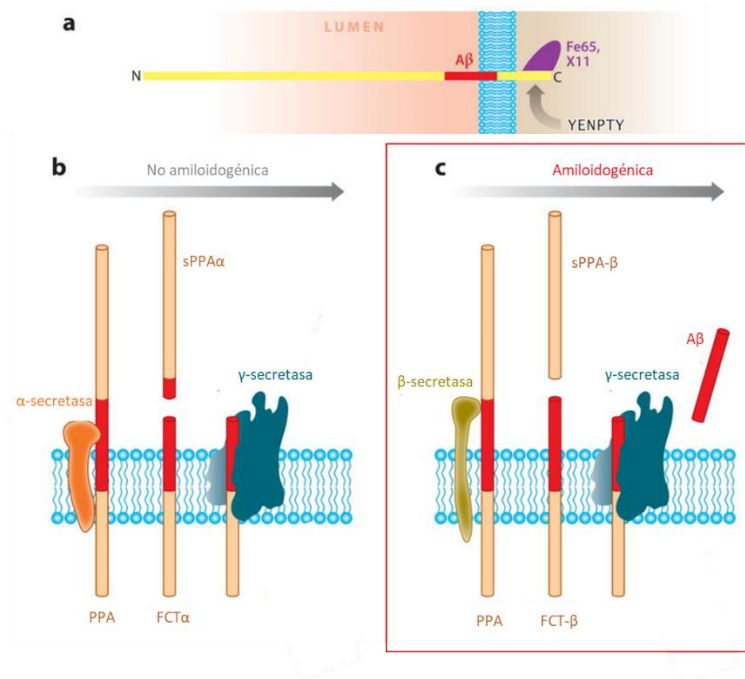


Figura 5. Vías de escisión de la proteína precursora amiloidea (PPA). (a) La PPA tiene un largo dominio N-terminal, así como un dominio C-terminal más corto que contiene una secuencia de Tirosina-Ácido glutámico-Asparagina-Prolina-Treonina-Tirosina (YENPTY). (b) Vía no amiloidogénica procesada por α - y γ -secretasa. (c) La vía amiloidogénica (resaltado en rojo) mediada por BACE1 y posteriormente γ -secretasa. Ambos procesos generan dominios solubles (sAPP α y sAPP β) y fragmentos intracelulares de C-terminal (Modificado de O'Brien and Wong, 2011).

2.6 Herramientas de diagnóstico

El curso clínico de la EA es progresivo y existen diversos métodos de diagnóstico dependiendo de la etapa de desarrollo en la que se encuentre (Brookmeyer et al., 2018). Se postula que pasando de un estado normal (etapa 1) la EA inicia con amiloidosis asintomático, que refiere a la deposición de A β (etapa 2). La detección se realiza mediante biomarcadores específicos para acumulación de A β como la imagen amiloidea por PET o A β 42 en fluido cerebroespinal (Brookmeyer et al., 2018). La PET con ¹⁸F-fluorodesoxiglucosa (FDG) mide la captación de glucosa de las neuronas y las células gliales y es sensible a la disfunción sináptica (Scheltens et al., 2016). Un estudio de PET con FDG normal excluye el diagnóstico de enfermedad neurodegenerativa y, por el contrario, una exploración positiva sugiere EA en etapas tempranas (Scheltens., 2016). Tiempo después del inicio de la amiloidosis, la enfermedad avanza a neurodegeneración (etapa 3 - 4), la cual puede ser detectada por biomarcadores como incremento de la proteína ptau en fluido cerebroespinal, disfunción neuronal basada en PET con FDG o atrofia cortical del hipocampo en resonancia magnética volumétrica (Albert et al., 2011). El incremento de amiloidosis y neurodegeneración correlaciona con la aparición de deterioro cognitivo leve (etapa 5) (Brookmeyer et al., 2018). La EA clínica temprana (etapa 6) se caracteriza por dificultad para recordar conversaciones, nombres o eventos recientes. La apatía y la depresión también suelen ser síntomas tempranos y los síntomas de EA tardía (etapa 7) se caracterizan por problemas de comunicación, desorientación, confusión, falta de juicio, cambios de comportamiento y, en última instancia, dificultad para hablar, tragar y caminar (Brookmeyer et al., 2018; Physicians, 2020). Aunque todas estas características neuropatológicas y neuropsicológicas son marcadores diagnósticos útiles, la pérdida de sinapsis del sistema límbico, la afectación de regiones neocorticales y el prosencéfalo basal por defectos en la neurotransmisión, afectación del transporte axonal, cascadas de señalización, respuesta inmune alterada y las

lesiones provocadas por acumulación de A β y MNFs, son el mejor correlato del deterioro cognitivo en pacientes con EA (Serrano-Pozo et al., 2011; Rajmohan et al., 2017).

2.7 Biomarcadores

Las demencias son causadas por una evolución de procesos neurodegenerativos en el cerebro que generalmente se extiende a lo largo de décadas y se presentan como un continuo desde la función cerebral normal a través de una fase de deterioro cognitivo leve hasta manifestar demencia con pérdida de función (Koenig et al., 2020). Por tanto, se necesita una prueba de diagnóstico óptima que tenga una alta sensibilidad para detectar un trastorno cerebral progresivo en la fase preclínica (biomarcador), y que además tenga especificidad para diferenciar los procesos patogénicos específicos o las enfermedades que los causan (Koenig et al., 2020).

La medición molecular por líquido cefalorraquídeo (LCR), donde se miden los niveles de A β 40, A β 42, tau total (t-tau), ptau y polipéptido ligero de neurofilamento (NFL), entre otros biomarcadores, es el método comúnmente utilizado (Ayodele et al., 2021a). En líquido cefalorraquídeo, A β 42 es el primer péptido en acumularse (Seubert et al., 1992), el problema es que cuando las placas amiloideas empiezan a formarse, se reduce la concentración de A β 42 en LCR, lo que limita su cuantificación (Scheltens et al., 2016; Blennow et al., 2018). Posteriormente, ptau se mide para evaluar la evolución de neurodegeneración y la presencia de MNF, mientras que t-tau refleja lesión neuronal o neurodegeneración (Scheltens et al., 2016; Ayodele et al., 2021). Consistente con esto, muchos sitios de fosforilación, los cuales pueden detectarse con los marcadores AT8 (Ser199/202/Thr205), AT100 (Thr212/Ser214), AT180 (Thr231/Ser235) y PHF-1 (Ser396/404), se han asociado con el proceso patológico (Mondragón-Rodríguez et al., 2012; 2014; 2017), siendo las fosforilaciones cercanas a los MBD (Ser396/404; Thr231/S235; Ser262) un evento detectado en etapas tempranas de la EA y patologías

asociadas (Ittner et al., 2010; Mondragón-Rodríguez et al., 2014). Una diferencia entre los biomarcadores de LCR y PET es que mientras en LCR se puede determinar la cantidad de péptido, el escaneo por PET muestra la distribución de éste (Blennow et al., 2018).

Por otra parte, se han reportado cambios en la actividad eléctrica oscilatoria de alta y baja frecuencia registrada en regiones frontocentrales de pacientes en etapa 2 de EA mediante electroencefalograma (EEG) (Gaubert et al., 2019). El EEG es una técnica que mide, de manera no invasiva, la función sináptica en tiempo real y es fácil de administrar en un entorno ambulatorio (Koenig et al., 2020). Por definición, debería ser un método de elección para estudiar la disfunción cerebral en condiciones causadas por el colapso gradual de las redes neuronales funcionales (Koenig et al., 2020). En sujetos con acumulación temprana de A β y ptau se modifican diversos parámetros de EEG en regiones frontocentrales, tal como un incremento de la amplitud de la banda delta, disminución en amplitud de las bandas beta y gamma y, un incremento de conectividad funcional dependiente de un estado de conciencia (Gaubert et al., 2019).

En este sentido, cambios registrados en el EEG, al ser una técnica no invasiva, barata y disponible, podría usarse como una herramienta de detección para identificar a las personas con alto riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas en etapas preclínicas (Gaubert et al., 2019; Koenig et al., 2020). De esta manera, los biomarcadores de EEG se postulan como herramientas útiles para medir y monitorizar la neurodegeneración (Gaubert et al., 2019).

2.8 Actividad cerebral

La EA se caracteriza por déficits cognitivos relacionados a actividad aberrante del hipocampo, el cual cumple un papel importante en el aprendizaje y memoria (Lisman et al., 2017; Voss et al., 2017; Mondragón-Rodríguez et al., 2018; 2020a). Es importante destacar que, debido a una actividad sincrónica coordinada de

múltiples ensamblajes neuronales, el hipocampo es conocido por estar involucrado en la generación de actividad eléctrica (Goutagny et al., 2009; Goodman et al., 2018; Mondragón-Rodríguez et al., 2018; Soltani-Zangbar et al., 2020), el almacenamiento de la memoria y el procesamiento de la información (Lisman et al., 2017; Goodman et al., 2018). Diversos estudios sugieren que el acoplamiento de frecuencia cruzada entre la fase de theta (3-10 Hz) y la amplitud de gamma (25-80 Hz) subyace en los procesos de la memoria de trabajo en el hipocampo y corteza (Goutagny et al., 2013; Mondragón-Rodríguez et al., 2018; Soltani Zangbar et al., 2020). Aunque el mecanismo exacto detrás de este complejo fenómeno sigue siendo desconocido, se cree que este acoplamiento, generado por la actividad sincrónica de múltiples conjuntos neuronales, incluidas las neuronas piramidales e interneuronas PV+, desempeña un papel importante en funciones cognitivas como memoria, toma de decisiones y procesamiento de información para navegación espacial (Buszáki et al., 2003; Lisman et al., 2017; Mondragón-Rodríguez et al., 2018; Soltani-Zangbar et al., 2020). De manera específica, cada conjunto neuronal se dispara durante un ciclo gamma específico; los elementos que siguen en la secuencia están representados por ciclos gamma consecutivos (Booth et al., 2016). Dado que el ciclo theta es más lento que el de gamma, los ensamblajes que se disparan dentro de cada ciclo gamma están asociados con diferentes fases del ciclo theta, esto resulta en una modulación más fuerte de la amplitud gamma por la fase de theta (Buszáki et al., 2003; Klausberger et al., 2003; Belluscio et al., 2012; Lisman et al., 2013).

Como se mencionó, la magnitud del acoplamiento también se ha relacionado con la memoria de trabajo en ratas y humanos, de manera que las funciones corticales superiores dependen de la actividad de red sincrónica (Klausberger et al., 2003; Colgin, 2016). No es de sorprender que datos recientes muestran que la actividad oscilatoria en la banda de frecuencia theta y gamma está alterada en pacientes con EA (Zhan et al., 2016).

Se han postulado a las interneuronas PV+, que controlan el ajuste fino de las oscilaciones de la red neuronal, como principales causales de las modificaciones

en los circuitos neuronales sinápticos y las alteraciones cognitivas en la EA (Verret et al., 2012; Palop et al., 2016; Mondragón-Rodríguez et al., 2018; 2020a). Según esta hipótesis, las alteraciones de la red cerebral, más que la deposición de proteínas, podrían explicar la patogénesis temprana del desarrollo de la enfermedad (Verret et al., 2012; Palop et al., 2016; Mondragón-Rodríguez et al., 2018). Sin embargo, evidencia reciente ha llevado al campo a considerar los péptidos A β solubles (por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros y oligómeros superiores) en lugar de agregados insolubles, como la causa de la disfunción sináptica y la desorganización de la red (Mondragón-Rodríguez et al., 2018; Selkoe et al., 2016; Walsh et al., 2020).

En personas con riesgo elevado de desarrollar la EA, se ha encontrado actividad cerebral anormal de las redes durante la codificación de la memoria en la etapa prodrómica de la EA (Gaubert et al., 2019). En línea con estos resultados, en nuestro laboratorio se demostraron alteraciones rítmicas hipocampales en el modelo J20 de ratón transgénico que desarrolla PA β a los 5-7 meses de edad (Mondragón-Rodríguez et al., 2018). Específicamente, a los 30 días de edad se detectaron alteraciones en los patrones de actividad oscilatoria en la banda de theta y en los patrones de acoplamiento theta/gamma (Mondragón-Rodríguez et al., 2018). Además, se encontró una reducción en la excitabilidad de las interneuronas PV+, lo que podría explicar la inestabilidad de los patrones de actividad oscilatoria en la banda de theta (Mondragón-Rodríguez et al., 2018).

De manera importante, estos hallazgos precedieron a la aparición de PA β y alteraciones de tipo cognitivas, lo que podría reflejar potencialmente la etapa prodrómica de la EA (Mondragón-Rodríguez et al., 2017). Estos hallazgos son importantes ya que podrían postular a las alteraciones neuronales como biomarcadores que ayuden a detectar etapas tempranas en el desarrollo de la EA.

2.9 Opciones terapéuticas basadas en tau y A β

La EA sigue siendo una enfermedad poco controlada, en la que un estado agregado de proteínas tau y A β , propuestas como posibles causas de la enfermedad, siguen siendo el principal blanco terapéutico (Mondragón-Rodríguez et al., 2020). Considerando que los agregados de ptau se relacionan más con los déficits cognitivos que los agregados de A β , ptau ha emergido como el nuevo blanco terapéutico para el combate de la EA y enfermedades neurodegenerativas relacionadas (Mondragón-Rodríguez et al., 2012). De manera intuitiva, en búsqueda de parar la progresión de la enfermedad, la idea general consiste en inhibir la agregación de la proteína ptau (Mondragón-Rodríguez et al., 2017). Sin embargo, es de suma importancia tomar en cuenta no solo el papel patológico de ptau sino también su función fisiológica (Mondragón-Rodríguez et al., 2017). Se ha encontrado que la proteína tau cumple una función fisiológica en la terminal sináptica regulada por fosforilaciones en distintos sitios, interactuando con componentes de la densidad postsináptica incluyendo proteínas de andamiaje y complejos estabilizadores de receptores (Ittner et al., 2011; 2018; Mondragón-Rodríguez et al., 2012). Además, que las interacciones proteína-proteína son el mecanismo que le permite a la proteína tau participar en procesos como la estabilización de microtúbulos, transporte proteico, activación de receptores, etc. (Iqbal et al., 2016; Wang et al., 2016; Mondragón-Rodríguez et al., 2017).

La segunda estrategia terapéutica más utilizada es la eliminación de la fosforilación en la proteína tau (Tayeb et al., 2012). La GSK3 β ha sido propuesta como un objetivo de eliminación ya que se ha visto directamente relacionada con la hiperfosforilación de tau (Tayeb et al., 2012; Mondragón-Rodríguez et al., 2013). Sin embargo, esta estrategia de bloqueo no considera que GSK3 β participa en eventos sinápticos como potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD), por lo tanto, el inhibir su acción afectaría en procesos de consolidación y formación de memoria (Mondragón-Rodríguez et al., 2013). Otro abordaje que se ha intentado es mediante el bloqueo de los rNMDA con fármacos como la memantina (Reisberg et al., 2003). La memantina es un antagonista no

competitivo de los rNMDA (Reisberg et al., 2003; Tayeb et al., 2012). Se piensa que este fármaco tiene la capacidad de proteger a las neuronas de excesiva actividad glutamatérgica que resulta en excitotoxicidad, además de mejorar la LTP y disminuye la fosforilación de tau (Reisberg et al., 2003). No obstante, este medicamento tiene de poco a mediano efecto y no modifica la progresión de la enfermedad ni altera sus resultados finales (Tayeb et al., 2012).

Por otra parte, la investigación también se ha enfocado en la modulación de las vías de las enzimas que degradan PPA (Wong et al., 2004). En teoría, inhibiendo la actividad de la γ - y/o β -secretasa y estimulando la actividad de la α -secretasa podría llevar a una disminución en la producción de A β patológico (Tayeb et al., 2012). En este sentido, datos de nuestro laboratorio demostraron que, el bloqueo farmacológico de la producción de FCT- β mediante la inhibición de β -secretasa, restaura las alteraciones en actividad oscilatoria en un modelo de ratón transgénico J20 que desarrolla los marcadores histopatológicos de la EA (Mondragón-Rodríguez et al., 2018).

En resumen, la estrategia terapéutica de los últimos años basada en contrarrestar los agregados de las proteínas A β y ptau no ha generado resultados prometedores (Mondragón-Rodríguez et al., 2010, 2017; 2012b; 2020a).

2.10 Modelos Animales

Los modelos animales se han convertido en una herramienta fundamental para tratar de entender el mecanismo de las enfermedades neurodegenerativas, el requisito principal es reproducir con la mayor precisión posible la citopatología humana (Esquerda-Canals et al., 2017). Entre vertebrados, los roedores son las especies de mayor uso para modelado transgénico debido a su corto periodo de vida, costo bajo y procedimientos establecidos para modificación genética que facilita su uso (Esquerda-Canals et al., 2017).

En este sentido, el modelo transgénico rTg4510 que contiene la mutación para la proteína tau P301L, se caracteriza por el desarrollo de las lesiones constituidas

por la proteína tau anormalmente fosforilada (Ramsden et al., 2005). Este modelo empieza a mostrar déficits cognitivos a partir de los 2.5 meses de edad (Ramsden et al., 2005). De manera importante se ha reportado que estas alteraciones cognitivas correlacionan con atrofia y muerte celular en la región CA1 del hipocampo (Ramsden et al., 2005; Santacruz et al., 2005; Scott et al., 2016). Así mismo, a partir de los 5 meses de edad se empiezan a observar lesiones fibrilares (MNFs) en estructuras límbicas, iniciando en neuronas piramidales del CA1, distribuyéndose al CA2 y a los 8.5 meses en neuronas piramidales del CA3 y neuronas granulares del giro dentado (Ramsden et al., 2005; Santacruz et al., 2005).

Por otro lado, se han desarrollado otros modelos transgénicos que promueven la expresión de la proteína tau, tal como el htau.P301S (Allen et al., 2002). Este modelo transgénico expresa la isoforma de tau de 383 aminoácidos con 4 repeticiones de MBD sin insertos N-terminal (4R/0N) (Allen et al., 2002). Así mismo, empieza a mostrar déficit de memoria y aprendizaje a partir de los 2.5 meses (Xu et al., 2014), pérdida neuronal a partir de los 3 meses en médula espinal (Hampton et al., 2010), a los 4 meses se empieza a detectar formación de MNF y un déficit motor temprano, progresivo y severo, desarrollando parálisis parcial de miembros inferiores (paraparesia) de los 5 a 6 meses de edad (Allen et al., 2002).

Otro modelo utilizado es el htau (Andorfer et al., 2003), el cual expresa 6 isoformas de tau humana pero no expresa tau murina (Andorfer et al., 2003). Este modelo empieza a mostrar déficit cognitivo a partir de los 6 meses, a partir de los 9 meses se empiezan a observar formación de MNF y entre 10 y 14 meses de edad empieza la pérdida neuronal (Andorfer et al., 2003).

Ahora bien, entre estos modelos, el más popular y caracterizado es el modelo rTg4510, ya que reproduce el proceso de neurodegeneración tal como la observada en humanos (Ramsden et al., 2005; Santacruz et al., 2005). Este modelo transgénico expresa altos niveles de tau mutante (13 veces el nivel de proteína tau murina endógena) y desarrollo progresivo dependiente de edad de

formación de MNF, pérdida neuronal y déficits cognitivos (Ramnsden et al., 2005), esto permite, a diferencia de modelos más agresivos como htau.P301S, estudiar las etapas del proceso neurodegenerativo en edad adulta temprana. Así mismo, en otros modelos como htau el proceso neurodegenerativo inicia en edades mayores, a comparación de rTg4510, lo que genera más costos y cuidados para su manutención.

3. JUSTIFICACION

Las estrategias terapéuticas destinadas a combatir el progreso de las patologías de tipo neurodegenerativo desarrolladas en los últimos años han evidenciado poca efectividad (Mondragón-Rodríguez et al., 2010, 2013, 2017; 2012b; 2020a). Esto debido a que la detección e intervención se realiza durante etapas muy avanzadas de neurodegeneración, es decir, cuando ya se tiene un deterioro significativo en el cerebro de los sujetos que sufren este tipo de patologías (Brookmeyer et al., 2007; Albert et al., 2011; Serrano-Pozo et al., 2011). Por tal motivo, el desarrollo e implementación de nuevos biomarcadores que permitan diagnosticar a estas patologías durante etapas iniciales o tempranas se hace indispensable. Considerando esto, los datos generados en esta propuesta de investigación contribuirán de manera importante al desarrollo de nuevos biomarcadores basados en alteraciones de los patrones de actividad oscilatoria.

4. HIPÓTESIS

Si la proteína ptau interactúa y contribuye al proceso de neurodegeneración durante estados avanzados de la patología, entonces su presencia durante estadios tempranos causará alteraciones en los patrones de actividad oscilatoria.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estudiar el efecto de la proteína ptau mutada en la modulación de la actividad oscilatoria durante etapas tempranas de la neurodegeneración.

5.2 Objetivos Particulares

- 5.2.1 Evaluar los patrones de actividad oscilatoria a nivel de frecuencia generados en el hipocampo del modelo de taupatías rTg4510.
- 5.2.2 Estudiar alteraciones moleculares en neuronas en el modelo rTg4510.
- 5.2.3 Evaluar la potencial perdida neuronal en las principales estructuras del hipocampo del modelo rTg4510.
- 5.2.4 Estudiar potenciales alteraciones en las interneuronas GABAérgicas que expresan Parvalbúmina.

6. METODOLOGÍA

6.1 Modelos animales

Los experimentos se realizaron en ratones con una edad de entre 30 y 35 días. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con el comité de bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM bajo el protocolo No. 050, para el uso de animales en la investigación científica. En la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM y de acuerdo con el protocolo de genotipificación de los Laboratorios Jackson, se confirmó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) el genotipo de cada uno de los animales empleados. Se utilizaron ratones hembra y machos del modelo transgénico rTg4510 que expresan la mutación P301L de la proteína tau, así como ratones que no expresan la mutación (No-Tg). El uso de animales se realizó de acuerdo con la norma NOM-062-ZOO-1999 (especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio). Los sujetos se mantuvieron bajo condiciones de bioterio, una dieta para ratón (Purina Chow fórmula 5001), agua ad libitum, a una temperatura entre 20 – 25°C, humedad de 40 – 70% y ciclo de luz/oscuridad de 12 hr.

6.2 Registros electrofisiológicos

Para realizar los registros electrofisiológicos se anestesiaron a los sujetos experimentales con uretano (dosis: 1 g/kg; vía intraperitoneal), se montaron en el estereotáxico, se mantuvo la temperatura constante utilizando una cama térmica, se retiró el periostio y se realizó una craneotomía en las coordenadas correspondientes a la región de CA1 del hipocampo (AP: - 2.0 mm, ML: \pm 2.0 mm, DV:1.9 mm con respecto a Bregma). Se utilizaron electrodos bipolares de acero inoxidable (tamaño de 100 μ m y una resistencia de entre 1.5 y 3.4 M Ω) y se ubicaron según las coordenadas objetivo. Durante un periodo de 10 minutos se permitió la estabilización de la señal, luego se registró la actividad espontánea por 10 minutos. La señal eléctrica fue amplificada (Grass Instruments 7P511 (A-M

System, USA), filtrada (0.1 – 300 Hz) a una frecuencia de muestreo de 1000 Hz. Los registros fueron digitalizados con una MiniDigi 1A (Molecular Devices, LLC). Previa anestesia con pentobarbital (200mg/Kg) vía intraperitoneal, se le practicó la eutanasia al ratón para la confirmación de la ubicación del electrodo de registro en el cerebro.

6.3 Análisis de registros electrofisiológicos

Los datos electrofisiológicos se analizaron utilizando los programas computacionales pClamp y MATLAB. Los espectrogramas de potencia fueron obtenidos utilizando MATLAB. Se calculó la potencia relativa en las frecuencias de delta (1- 3 Hz), theta (3 – 10 Hz), beta (10 – 25 Hz), gamma (25 – 45 Hz) y gamma rápido (45 – 250 Hz).

6.4 Inmunofluorescencia y caracterización por microscopía

Por inmunofluorescencia, se realizó una caracterización *in situ* de los agregados de la proteína tau, utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen a la proteína tau fosforilada AT180 (Thermo Fisher), anti-Ser396 (Invitrogen), tau-5 (Sigma Aldrich) así como anti-PV (Synaptic Systems) para identificar interneuronas. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron dirigidos hacia una especie en particular de animal y específicos para las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de ratón (Anti-Mo IgG μ específico, Anti-Rb IgG, etc.), acoplados a diferentes fluoróforos; verde (FITC/Alexa 488) y rojo (TRITC/Alexa 596) (Invitrogen, CA y Molecular Probes, USA.). La incubación con los anticuerpos primarios se realizó a 4°C y se incubó durante toda la noche. Después de hacer tres lavados cuidadosos con PBS-Tritón X-100 al siguiente día, se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios respectivos por dos horas a temperatura ambiente. Las laminillas preparadas se observaron en un microscopio de fluorescencia Axio Imager 2 Zeiss (Alemania). Las imágenes de fluorescencia colectadas se procesaron para su presentación y cuantificación con el programa ZEN Blue, (Zeiss, Alemania). Se realizaron cortes ópticos de entre 0.7 μ m y 1 μ m

a lo largo del eje z de la muestra para proyectarse después como una imagen bidimensional que representa la sumatoria de los planos.

6.5 Análisis morfológico

Para la reconstrucción de neuronas individuales, las imágenes de fluorescencia se importaron al software de reconstrucción NeuroLucida (MBF Bioscience, Williston, VT). Primero se trazó manualmente la estructura dendrítica y del soma. Después, los datos de reconstrucción fueron importados al software NeuroExplorer (MBF Bioscience). Se determinó el área de cada soma. Se midió la longitud total y número de dendritas por célula utilizando un análisis Scholl, también en el software NeuroExplorer.

6.6 Densitometría celular

La cuantificación morfométrica por área fue realizada en 3 campos microscópicos elegidos aleatoriamente en las áreas hipocampales de interés. Las observaciones se realizaron mediante microscopía de campo claro utilizando un microscopio Zeiss (Axioplan 2, Zeiss, Alemania). Se realizó un conteo de núcleos neuronales de las regiones hipocampales de interés. Dos a tres portaobjetos fueron analizados por cada ratón. Se realizó un conteo de células en las regiones de interés por ratón y promediado por grupo. La identificación y conteo de células ptau positivas se realizó mediante los lentes objetivos 20x y 40x. Todos los conteos celulares fueron convertidos a un valor de densidad (células ptau positivas/mm²) tal como se ha reportado previamente (Mukaetova-Ladinska et al., 1993; Mondragón-Rodríguez et al., 2008; 2014). Para conteo y, en caso de observación crítica para identificación de células ptau positivas, se utilizaron lentes de bajo aumento. Se registró el número de células ptau positivas por milímetro cuadrado del CA1, CA2, CA3, Giro Dentado (GD) y Subículum (Sub). Se tomaron imágenes del canal fluorescente con un tiempo de exposición que se mantuvo constante en todas las imágenes del portaobjetos.

7. RESULTADOS

7.1 La actividad oscilatoria en hipocampo de ratones jóvenes rTg4510

Resultados reportados sugieren que, una acumulación muy temprana de ptau intracelular en las neuronas del hipocampo tiene un impacto en la actividad de la red hipocampal (Mondragón-Rodríguez et al., 2018). Para abordar esta interrogante, se estudió la actividad oscilatoria intrínseca generada espontáneamente en el hipocampo del modelo rTg4510 de 30-35 días de edad (Fig. 6A). De acuerdo con reportes previos (de Calignon et al., 2009), la actividad poblacional de neuronas de los animales No-Tg mostró actividad theta rítmica en el área del hipocampo (Fig. 6B). Los registros filtrados confirmaron la presencia de actividad rítmica de la red del hipocampo en la frecuencia de banda theta [3-10 Hz] y frecuencias gamma [>25 Hz] (Fig. 6B, registros inferiores). De la misma manera, la actividad de la red hipocampal registrada de ratones jóvenes rTg4510 evidenció actividad rítmica en frecuencias theta [3-10 Hz] y frecuencias gamma [>25 Hz] (Fig. 6C, registros inferiores). Los espectrogramas mostraron una potencia estable en las frecuencias theta en el grupo No-Tg (8.41 ± 1.39 Hz, Fig. 6D) y en el grupo de ratones rTg4510 jóvenes (7.13 ± 0.52 Hz, Fig. 6D). El análisis estadístico confirmó una disminución significativa en la actividad theta del hipocampo en el grupo rTg4510 joven cuando se comparó directamente con el grupo No-Tg ($p = 0.04$, Fig. 6D).

En resumen, el estudio electrofisiológico demostró alteraciones rítmicas en las frecuencias de banda theta en el CA1/subículum en ratones jóvenes rTg4510.

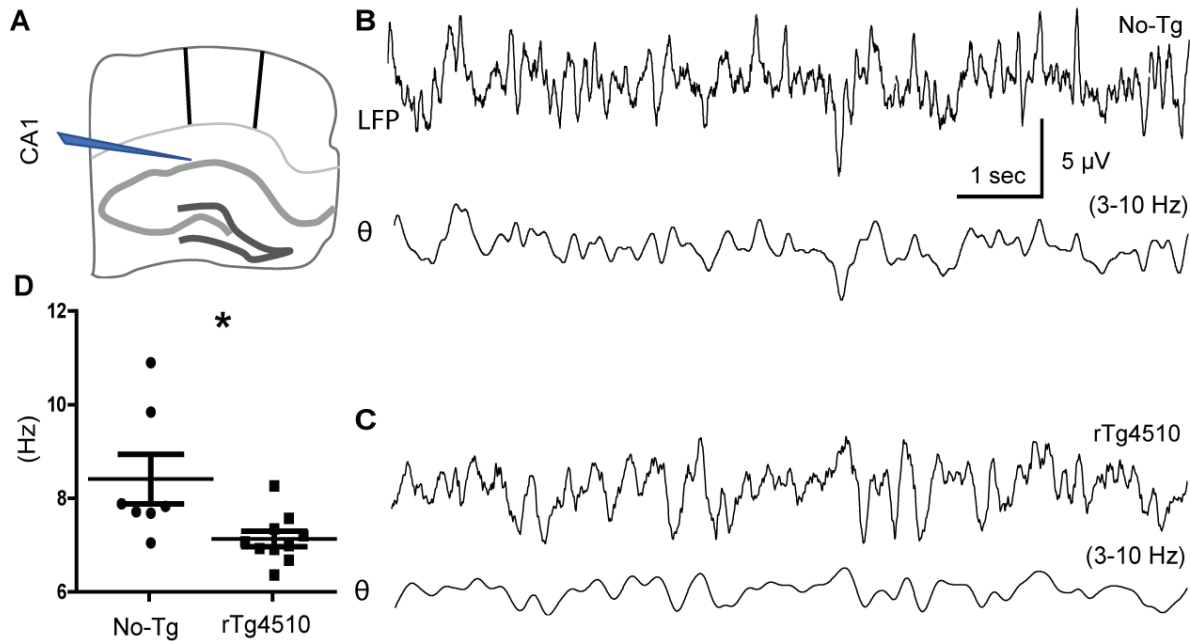


Figura 6. La actividad oscilatoria está alterada en el hipocampo de ratones jóvenes rTg4510. Sitio de registros *in-vivo* en el hipocampo (A). Registros representativos de actividad espontánea en el hipocampo del modelo No-Tg (B, registros superiores) y modelo rTg4510 (C, registros superiores). Los mismos registros presentados después de filtrarlos por la banda theta (B y C, 3-10 Hz, registros inferiores). La actividad oscilatoria en frecuencia theta disminuye significativamente en el modelo rTg4510 cuando se compara con el grupo No-Tg (D), * representa una diferencia significativa $p < 0.05$.

7.2 Neuronas del modelo rTg4510 joven muestran acumulación intracelular de ptau

La caracterización inmunohistoquímica del modelo rTg4510 joven reveló la presencia de ptau intracelular en neuronas (Fig. 7), en donde se detectó un incremento en los niveles de fosforilación de la proteína tau en los sitios cercanos al MBD, Thr231/Ser235 y Ser396, detectado por los anticuerpos AT180 y anti-Ser396 (Fig. 7 y 8). De manera importante, el número total de neuronas ptau positivas se encontró significativamente incrementado en el modelo rTg4510 joven cuando se comparó con el grupo No-Tg de la misma edad (No-Tg = 5.9 ± 0.82 células/mm²; rTg4510 mean = 36.20 ± 4.9 células /mm², prueba-t no pareada de 2

colas, $t = 6.066$, $df = 10$, $p = 0.0001$, $n = 6$). El incremento se detectó en células hipocámpales (Fig. 7A-7C y 8A-8C) y de la corteza del modelo rTg4510 joven (Fig. 7D-7F y 8D-8F). Células piramidales revelan acumulación de ptau (Fig. 7A y 8B). De manera importante, interneuronas hipocámpales PV+ (Fig. 8A) acumulan ptau (Fig. 8B y 8C, ver flechas). En el mismo sentido, interneuronas situadas en la corteza (Fig. 8D) acumulan ptau (Fig. 8E y 8F, ver asteriscos). Un análisis detallado reveló un marcaje difuso de ptau en el citoplasma, a veces comprendido por pequeñas regiones puntiformes (Fig. 8D'-F').

En resumen, encontramos que ptau en los sitios Thr231/Ser235 y Ser396 incrementa en etapas de progresión de tauopatías muy tempranas. Además, ptau en los sitios cercanos al MBD se expresa en diferentes tipos neuronales del modelo joven rTg4510.

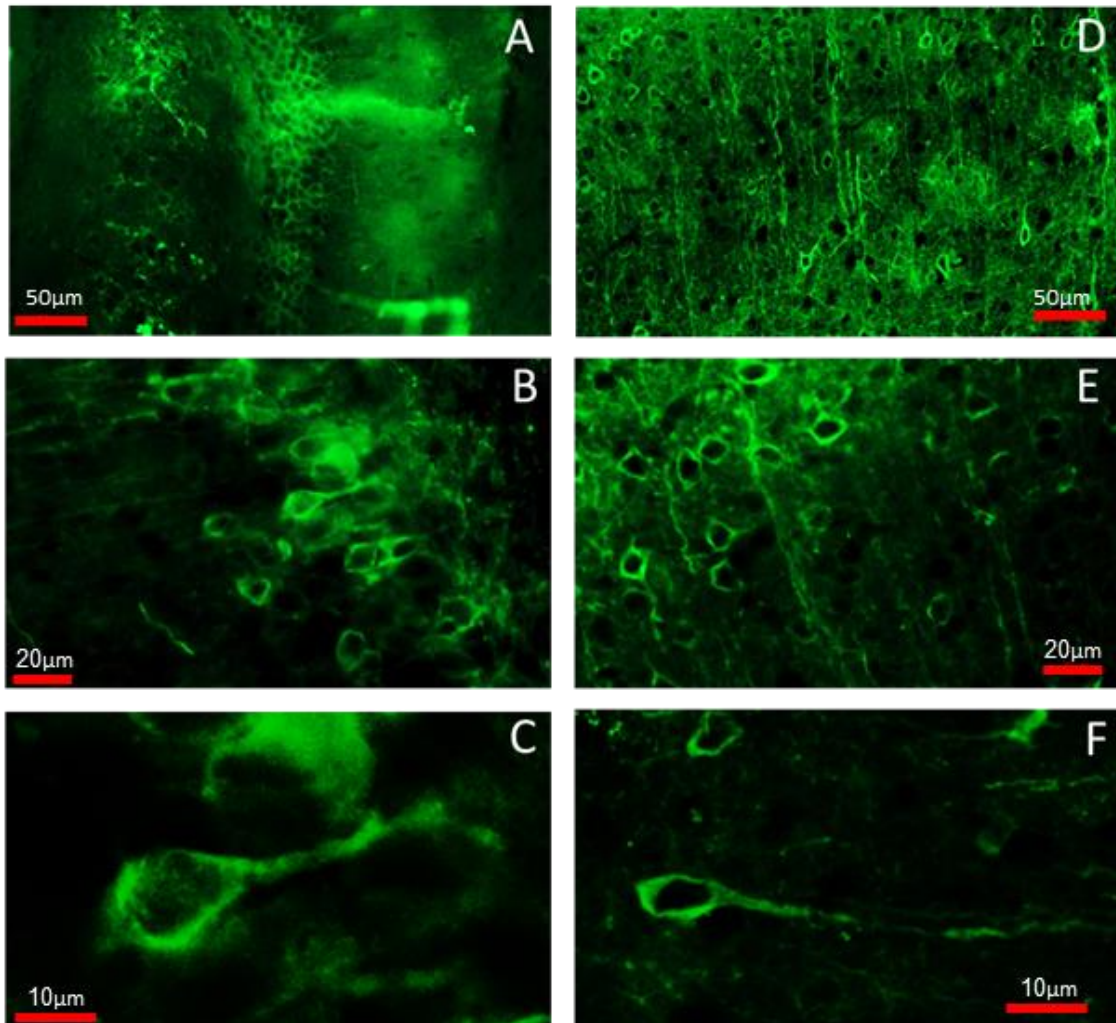


Figura 7. ptau intracelular en neuronas del hipocampo y corteza del modelo joven rTg4510. Acumulación de ptau detectada por AT180 en células hipocámpales (A-C) y de corteza (D-F) del grupo rTg4510 en etapas tempranas de tauopatías.

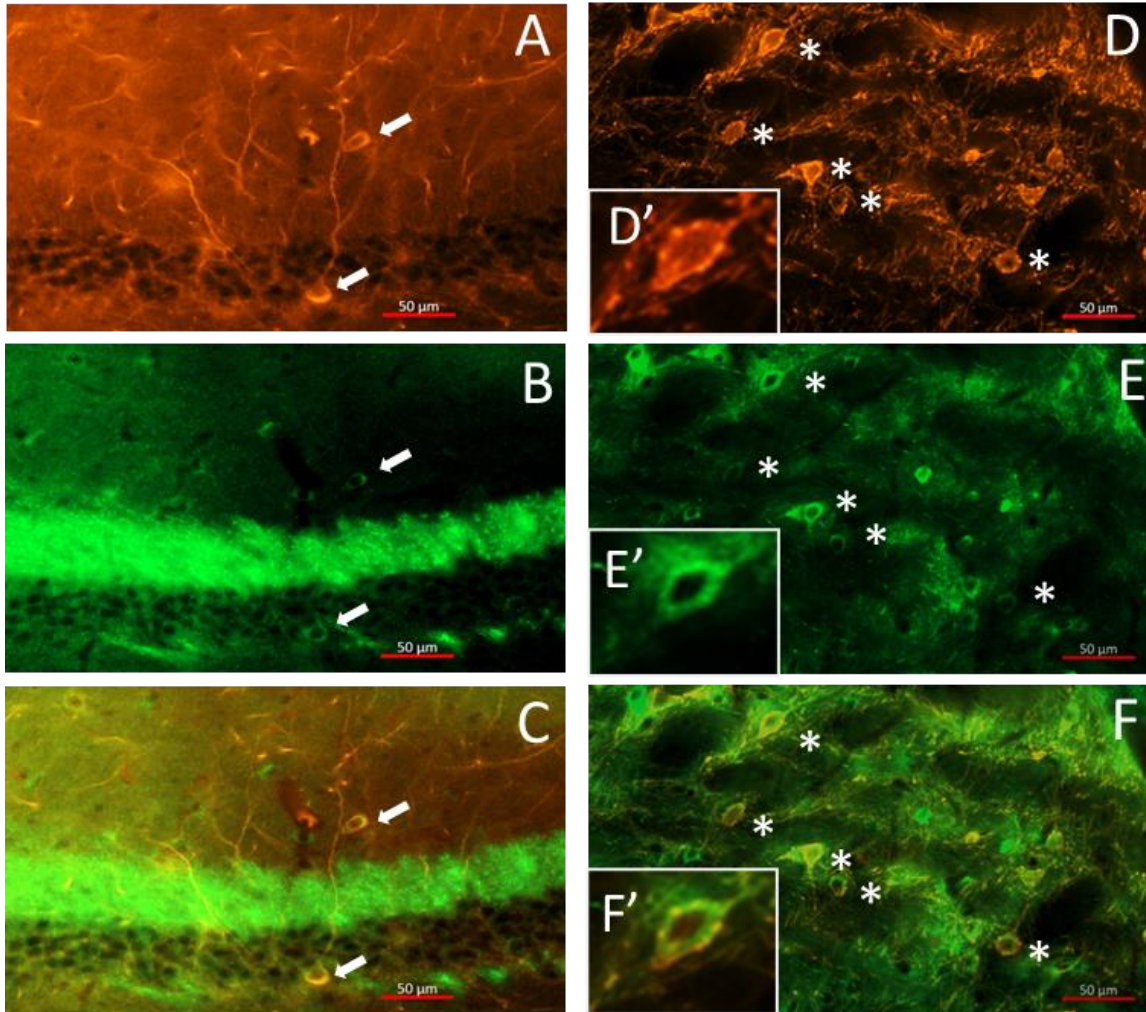


Figura 8. ptau intracelular en neuronas del hipocampo y corteza del modelo joven rTg4510. Acumulación de ptau detectada por anti-Ser396 en células hipocámpales (A-C) y de corteza (D-F) del grupo rTg4510 en etapas tempranas de tauopatías. Interneuronas hipocámpales (A) y de corteza (D) acumulan ptau (B-C y E-F). Interneuronas revelaron una acumulación puntada de ptau en el citoplasma (D'-F').

7.3 No se detectan alteraciones estructurales en el hipocampo en modelo rTg4510 joven

La densidad nuclear en CA1 y subículum se encontró similar de manera significativa entre ambos grupos (CA1 No-Tg Vs CA1rTg4510 prueba-t no pareada

2-colas, $t = 0.06355$, $df = 10$, $p = 0,9506$; Mann-Whitney $U = 17$, $p = 0,9372$, SubNo-Tg Vs SubrTg4510 prueba-t no pareada de 2 colas, $t = 1.932$, $df = 10$, $p = 0,0821$; Mann-Whitney $U = 8$, $p = 0.132$, Fig. 9A). Al momento de analizar el número de neuronas ptau-positivas, encontramos que el número de células ptau por mm^2 fue estadísticamente similar entre las áreas hipocampales (CA1 = 36.2 ± 13.2 células/ mm^2 ; CA2 = 36.37 ± 12.7 ; CA3 = 29.39 ± 4.84 , GD = 29.74 ± 22.56 ; CA1 Vs CA2 prueba-t no pareada de 2 colas $T = 0.0258$, $DF = 10$, $P = 0,9799$; Mann-Whitney $U = 17$, $p = 0.9372$, CA1 Vs CA3 prueba-t no pareada de 2 colas, $t = 1.161$, $df = 10$, $p = 0.2726$; Mann-Whitney $U = 10$, $p = 0.2403$, CA1 Vs GD prueba-t no pareada de 2 colas, $t = 0.6702$, $df = 10$, $p = 0.5179$; Mann-Whitney $U = 13.5$, $p = 0.5211$, Fig. 9B). Una comparación entre el Subículo y las áreas CA1, CA2 y CA3 reveló niveles más bajos de neuronas ptau positivas por mm^2 en el hipocampo (Sub = 19.78 ± 5.72 células/ mm^2 ; Sub Vs CA1 prueba-t no pareada de 2 colas, $t = 2.957$, $df = 10$, $p = 0.0144$; Mann-Whitney $U = 4$, $p = 0.026$; Sub Vs CA2 prueba-t no pareada de 2 colas, $t = 3.015$, $df = 10$, $p = 0.013$; Mann-Whitney $U = 3.5$, $p = 0.0247$; Sub Vs CA3 prueba-t no pareada 2-colas $t = 2.344$, $df = 10$, $p = 0.0411$; Mann-Whitney $U = 5$, $p = 0.0446$; Sub Vs GD prueba-t no pareada de 2 colas, $t = 1.182$, $df = 10$, $p = 0.2644$; Mann-Whitney $U = 15$, $p = 0.6879$, Fig. 9B). En resumen, los datos muestran que la acumulación de ptau en etapas tempranas del modelo rTg4510 precede a la pérdida y disminución en densidad celular en áreas hipocampales.

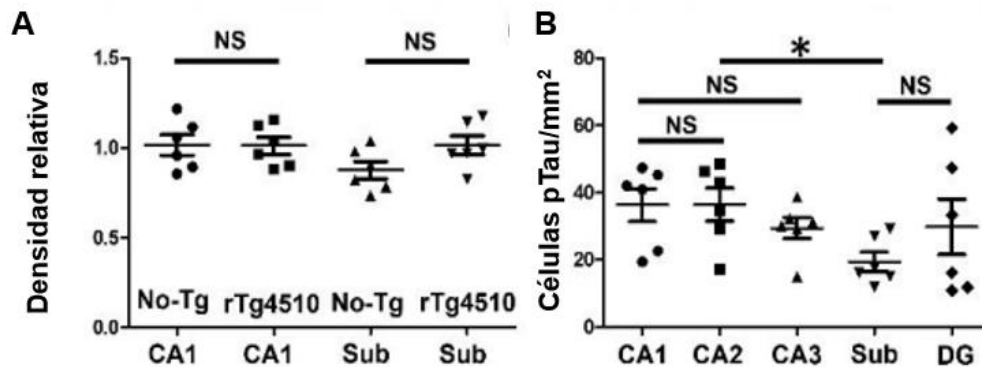


Figura 9. No hay alteraciones estructurales en el modelo rTg4510 joven. Cuantificación de células ptau positivas por mm² mostró que casi todas las áreas hipocampales del modelo rTg4510 joven tienen el mismo número de células ptau por mm² (A). El subículum mostró una cantidad menor de células ptau en comparación con otras áreas hipocampales (B). *representa una diferencia significativa p<0.05.

7.4 Morfología hipocampal en el modelo joven rTg4510

Para evaluar posibles cambios en el modelo joven rTg4510, se investigaron las características estructurales en áreas subhipocampales de los ratones rTg4510 en comparación directa con los ratones No-Tg de la misma edad. Se evaluaron parámetros importantes como el área del soma individual y número de ramificaciones dendríticas. Se encontró que el área nuclear (µm²) de la capa de células piramidales disminuyó significativamente en el grupo rTg4510 p30-35 (No-Tg = 14.29 ± 3.47; rTg4510 = 6.66 ± 0.98, p = 0.01, Fig. 9A). De acuerdo con los hallazgos en la capa piramidal, el área nuclear de la capa celular del giro dentado fue significativamente menor en el grupo rTg4510 p30-35 (No-Tg = 20.00 ± 4.14; rTg4510 = 11.11 ± 0.80, p = 0.01. Fig. 9B). El número de dendritas por célula en la capa piramidal no fue significativamente diferente entre el grupo rTg4510 p30-35 y el grupo No-Tg (No-Tg = 4.54 ± 0.24; rTg4510 = 3.84 ± 0.25, p = 0.06. Fig. 9C). De manera importante, se encontraron aumentos significativos en el número de dendritas por célula en el giro dentado de ratones rTg4510 p30-35 (No-Tg = 6.25 ± 0.69; rTg4510 = 8.33 ± 0.77, p < 0.001 Fig. 9D).

Aunque se confirmó la disminución del área individual de los somas en el grupo rTg4510 p30-35, el número de dendritas por célula no fue significativamente afectado en el grupo de ratones rTg4510 p30-35.

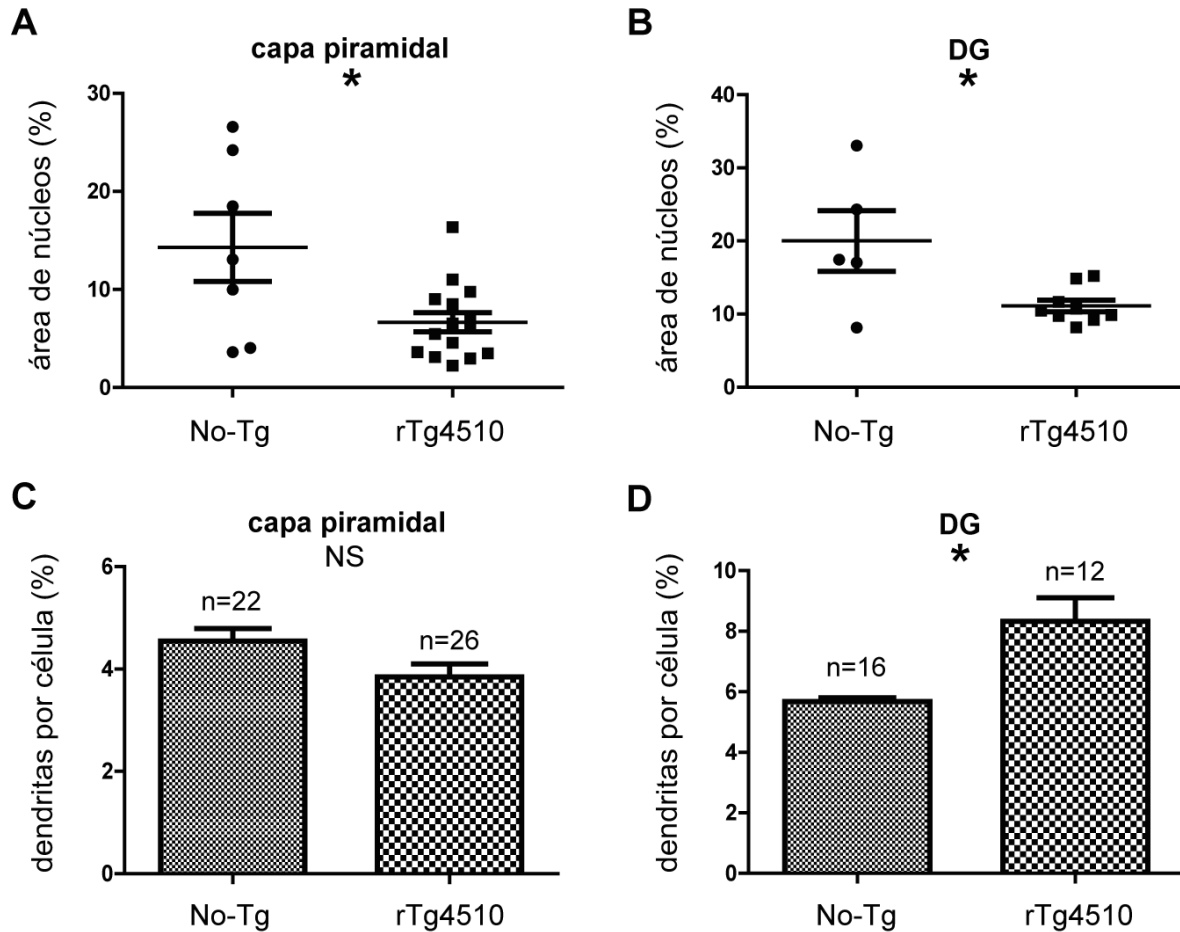


Figura 10. Análisis morfológico del hipocampo en los modelos rTg4510 y No-Tg. El área nuclear de la capa celular piramidal (A) y el giro dentado (B) se encontraron disminuidos de manera significativa en el grupo joven rTg4510. El número de dendritas por célula en el giro dentado (D), a diferencia de la capa piramidal (C), mostró diferencias significativas entre el grupo rTg4510 y el grupo No-Tg. Todas las gráficas muestran el promedio experimental y error estándar promedio, * representa una diferencia significativa $p < 0.05$.

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizó el estado neurofuncional del modelo joven rTg4510 que se caracteriza por el desarrollo de MNFs en etapas adultas (5 meses) (Ramsden et al., 2005). Los resultados muestran por primera vez que la actividad oscilatoria intrínseca generada de manera espontánea en el hipocampo del modelo rTg4510 de 30-35 días de edad se encuentra alterada (Fig. 6). De

manera específica, la actividad oscilatoria registrada en el CA1/subículum del hipocampo, se encontró disminuida de manera significativa (Fig. 6). Cabe mencionar que la región CA1/subículum del hipocampo es una de las regiones que se ven afectadas de manera severa en etapas tempranas del desarrollo de la EA (Boekhoorn et al., 2006). Además, la disminución observada en la frecuencia de theta se ha descrito en pacientes con características clínicas de la EA (Goutagny et al., 2013). En este contexto, los resultados obtenidos en este proyecto sugieren que la actividad cerebral generada por circuitos neuronales se encuentra comprometida desde etapas muy tempranas del proceso de neurodegeneración. De manera importante, hemos encontrado que estas alteraciones en la actividad eléctrica no correlacionan con alteraciones de tipo cognitivo y/o conductual (Xolalpa-Cueva et al., 2022). De hecho, el modelo de ratón joven rTg4510 se caracterizó por tener un mejor desempeño en pruebas de memoria y aprendizaje (Xolalpa-Cueva et al., 2022). Por lo anterior, los resultados obtenidos en este proyecto postulan a las alteraciones en la actividad oscilatoria como un potencial biomarcador preclínico de las patologías de tipo neurodegenerativo.

A nivel celular se ha propuesto que la acumulación progresiva de ptau es responsable de la degradación sináptica, pérdida neuronal y alteración de circuitos neuronales (Augustinack et al., 2002; Ramsden et al., 2005; Boekhoorn et al., 2006). En este sentido, se estudiaron posibles cambios morfológicos y estructurales asociados al aumento de ptau en el ratón rTg4510 joven. Los resultados evidenciaron un incremento en los niveles de fosforilación de la proteína tau en sus sitios próximos a sus sitios de unión a microtúbulos (Fig. 7 y 8). Primeramente, se evidenció que en el modelo joven rTg4510, la proteína ptau (sitios Ser396/Thr231/Ser235) se acumula a edad muy temprana (p30-35) en diferentes neuronas del hipocampo (Fig. 7 y 8). En línea con estos resultados, se ha reportado la hiperfosforilación de la proteína tau en los sitios Thr231/Ser235 en neuronas de la capa piramidal del CA1 en el modelo rTg4510 de 1 y 2 meses de edad (Hatch et al., 2017). Además, se ha reportado también la hiperfosforilación

de tau en los sitios Ser400, Ser404 y Ser412 en el modelo rTg4510 de 6 semanas de edad (Song et al., 2015). De manera interesante, se reporta que no hay hiperfosforilación de tau en los sitios Ser199/Ser202/Thr205 en el modelo rTg4510 a las 6 semanas de edad (Song et al., 2015). Lo que estos datos muestran es que, la hiperfosforilación de tau en la región próxima al carboxilo terminal (región de tau de unión a microtúbulos) es de los eventos más tempranos y ocurre antes de la aparición de las clásicas MNFs. De manera similar, esta secuencia de eventos de hiperfosforilación se ha observado en pacientes que cursan con la EA y otras tauopatías (Mondragón-Rodríguez et al., 2014).

A nivel celular, los resultados obtenidos en este proyecto evidenciaron un incremento de ptau en células piramidales e interneuronas PV+ del ratón rTg4510 joven (Fig. 7 y 8). Debido a que la interacción funcional entre las células piramidales y las neuronas PV+ participan en la producción y mantenimiento de los ritmos oscilatorios (Amilhon et al., 2015), los datos sugieren que los incrementos de ptau son responsables de las alteraciones electrofisiológicas. Es importante destacar que la afinidad de tau por los microtúbulos está regulada activamente por la fosforilación (Goedert et al., 2005). En este sentido, incrementos de fosforilación de la proteína tau reducen la unión de tau a los microtúbulos (Goedert et al., 2005; 2018). Además, se sabe que el aumento en niveles de fosforilación de tau dendrítica interrumpe la interacción entre tau y otras proteínas sinápticas como PSD95 lo que se traduce en alteración de la respuesta neuronal y potenciales alteraciones estructurales (Mondragón-Rodríguez et al., 2012a; 2020a; Ittner et al., 2016). De manera interesante, se observó que la hiperfosforilación de tau precede a cambios de densidad hipocampal (Fig. 9), indicando que la hiperfosforilación de tau ocurre antes de la pérdida neuronal. En línea con estos resultados, se ha reportado pérdida neuronal en el modelo rTg4510 después de 5 meses de edad (Spires et al., 2006). Además, al momento de evaluar cambios morfológicos en neuronas del hipocampo que expresan ptau, a pesar de haber reducción del área del soma individual en el hipocampo del grupo rTg4510, no se observa afección en el componente dendrítico (Fig. 10). Al

contrario, las células del giro dentado en el modelo rTg4510 muestran mayor número de dendritas por célula en comparación con el grupo No-Tg (Fig. 10). Como se mencionó, se ha descrito que a mayor cantidad de ptau existe disminución en el número de contactos sinápticos (Ittner et al., 2018) y retracción dendrítica (Crimins et al., 2012). Sin embargo, los datos presentados en este trabajo sugieren una mejora a nivel de la plasticidad sináptica, es decir un papel positivo para la presencia de la proteína ptau durante etapas tempranas de la neurodegeneración.

De acuerdo con la hipótesis clásica, tau se fosforila de manera anormal, se disocia de microtúbulos, se agrega en MNFs, se transloca de los axones a las espinas dendríticas y produce una disfunción sináptica (Ramsden et al., 2005; Boekhoorn et al., 2006; Ittner et al., 2010a; Hatch et al., 2017; 2018). Sin embargo, una hipótesis alterna propone que ptau se encuentra localizada fisiológicamente en las terminales sinápticas (Mondragón-Rodríguez et al., 2012; 2020; Ittner et al., 2018). Mediante la modulación de la actividad de los rNMDA, previene la hiperexcitabilidad y contribuye a la modulación de mecanismos plásticos involucrados en procesos de memoria y aprendizaje como la LTP y la LTD (Mondragón-Rodríguez et al., 2012; Ittner et al., 2018). Apoyando esta nueva hipótesis, se reportó una mejora del LTP y memoria en el giro dentado en un modelo transgénico tau-P301L de 10 semanas de edad (Boekhoorn et al., 2006). De acuerdo con esto, las células del giro dentado del modelo rTg4510 mostraron más dendritas por célula en comparación al grupo No-Tg de la misma edad (Fig. 10). Considerando que las espinas dendríticas son estructuras complejas que consisten en una densa red de moléculas citoesqueléticas, transmembranales, de andamiaje, y receptores de superficie (Chidambaram et al., 2019), esta última observación sugiere un papel muy interesante de ptau en la modulación de la morfología dendrítica que requiere mayor investigación.

En resumen, los resultados obtenidos en este proyecto indican que los cambios electrofisiológicos a nivel de la actividad oscilatoria preceden el declive neuronal en etapas tempranas de la neurodegeneración. Así mismo, la acumulación

temprana de ptau se relaciona con un mejoramiento en factores de plasticidad de las células del giro dentado, sugiriendo un papel positivo de ptau en etapas muy tempranas de la neurodegeneración. Adicionalmente, estos hallazgos contribuyen a la hipótesis que, en etapas tempranas del desarrollo neurodegenerativo, la proteína ptau se ve involucrada en procesos de neuroprotección.

9. ANEXOS

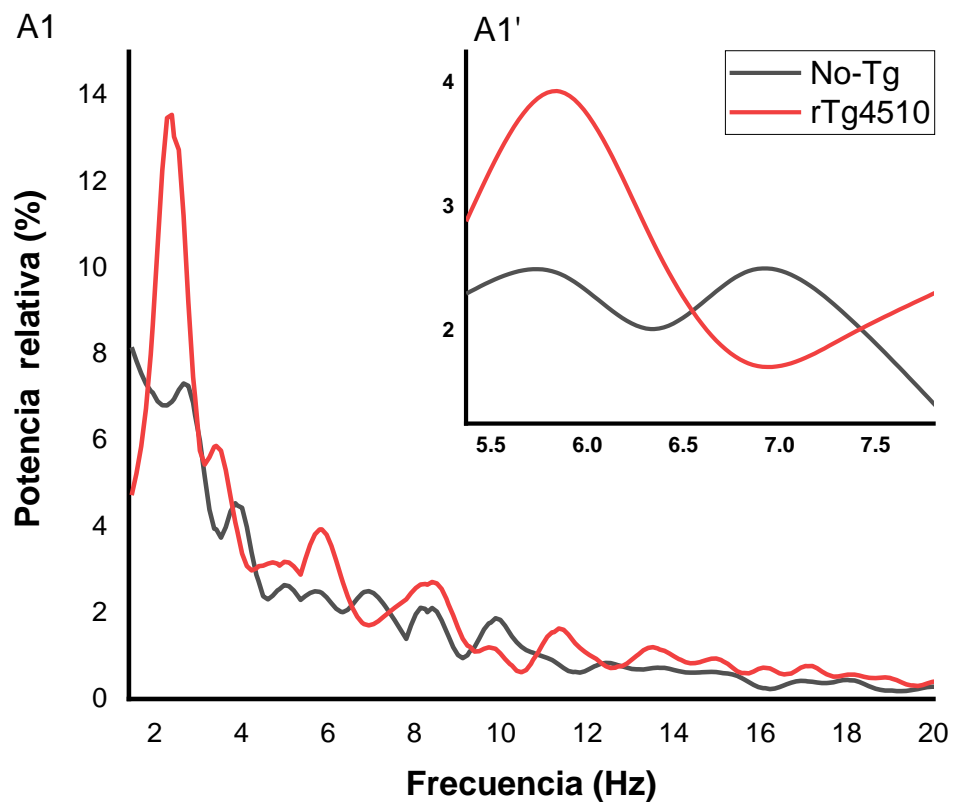


Figura A1. Espectros de potencia relativa. Cada espectro corresponde a la actividad registrada en el CA1 del hipocampo en el modelo rTg4510 joven (Rojo) y grupo no-tg (Negro) (A1). Ampliación del espectro donde se muestra la reducción de frecuencia del grupo Tg en comparación con el grupo no-tg (A1').

10. LOGROS ACADÉMICOS

- a) Cueva-Xolalpa Lorena, **García-Carlos Carlos Antonio**, Villaseñor-Zepeda Rocío, Orta-Salazar Erika, Díaz-Cintra Sofia, Peña-Ortega Fernando, George Perry and Mondragón-Rodríguez Siddhartha. *Hyperphosphorylated Tau relates to improved cognitive performance and reduced hippocampal excitability in the young rTg4510 mouse model of tauopathy. Journal of Alzheimer's Disease. Journal of Alzheimer's Disease. 2022 (Impact factor 4.47, ISSN 1875-8908)*. Autor de correspondencia S M-R, **Publicado (ver anexo I)**.
- b) **Carlos Antonio García-Carlos**, Lorena Xolalpa-Cueva, Rocío Villaseñor-Zepeda, Erika Ortega-Salazar, Sofía Díaz-Cintra, Fernando Peña-Ortega, George Perry, Siddhartha Mondragón-Rodríguez. *Hyperphosphorylated Tau remodels hippocampal function and morphology in the young rTg4510 mouse model of tauopathy. 7mo Foro Estatal de Investigación en Salud 2022, septiembre 2022 (Primer Lugar), ver anexo II.*
- c) **Carlos García-Carlos**, Lorena Cueva-Xolalpa, Rocío Villaseñor-Zepeda, Erika Orta-Salazar, Sofia Díaz-Cintra, Fernando Peña-Ortega and Siddhartha Mondragón-Rodríguez. *Hyperphosphorylated Tau remodel's hippocampal function and morphology in the young RTg4510 mouse model of tauopathy. 29 Jornadas Académicas INB, septiembre 2022 (Segundo Lugar), ver anexo III.*
- d) **Carlos García-Carlos**, Lorena Cueva-Xolalpa, Rocío Villaseñor-Zepeda, Erika Orta-Salazar, Sofia Díaz-Cintra, Fernando Peña-Ortega and Siddhartha Mondragón-Rodríguez. *Hyperphosphorylated Tau relates to reduced hippocampal excitability in the young rTg45410 mouse model of tauopathy. IV Congreso de Neurobiología de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Mex, abril 2022, ver anexo IV.*

Hyperphosphorylated Tau Relates to Improved Cognitive Performance and Reduced Hippocampal Excitability in the Young rTg4510 Mouse Model of Tauopathy

Lorena Xolalpa-Cueva^a, Carlos Antonio García-Carlos^a, Rocío Villaseñor-Zepeda^a, Erika Orta-Salazar^a, Sofia Díaz-Cintra^a, Fernando Peña-Ortega^a, George Perry^c and Siddhartha Mondragón-Rodríguez^{a, b, *}

^aUNAM Developmental Neurobiology and Neurophysiology, Institute of Neurobiology, National Autonomous University of México, Querétaro, México

^bCONACYT National Council for Science and Technology, Mexico City, México

^cUTSA Neuroscience Institute and Department of Biology, College of Sciences, University of Texas at San Antonio, San Antonio, TX, USA

Handling Deputy Editor: Jesus Ávila

Accepted 22 February 2022
Pre-press 21 March 2022

Abstract.

Background: Tau hyperphosphorylation at several sites, including those close to its microtubule domain (MD), is considered a key pathogenic event in the development of tauopathies. Nevertheless, we recently demonstrated that at the very early disease stage, tau phosphorylation (pTau) at MD sites promotes neuroprotection by preventing seizure-like activity.

Objective: To further support the notion that very early pTau is not detrimental, the present work evaluated the young rTg4510 mouse model of tauopathy as a case study. Thus, in mice at one month of age (PN30-35), we studied the increase of pTau within the hippocampal area as well as hippocampal and locomotor function.

Methods: We used immunohistochemistry, T-maze, nesting test, novel object recognition test, open field arena, and electrophysiology.

Results: Our results showed that the very young rTg4510 mouse model has no detectable changes in hippocampal dependent tasks, such as spontaneous alternation and nesting, or in locomotor activity. However, at this very early stage the hippocampal neurons from PN30-35 rTg4510 mice accumulate pTau protein and exhibit changes in hippocampal oscillatory activity. Moreover, we found a significant reduction in the somatic area of pTau positive pyramidal and granule neurons in the young rTg4510 mice. Despite this, improved memory and increased number of dendrites per cell in granule neurons was found.

Conclusion: Altogether, this study provides new insights into the early pathogenesis of tauopathies and provides further evidence that pTau remodels hippocampal function and morphology.

Keywords: Alzheimer's disease, hyperphosphorylation, memory, oscillatory activity, tau, tauopathies

*Correspondence to: Siddhartha Mondragón Rodríguez, Developmental Neurobiology and Neurophysiology, UNAM, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla, 76230 Santiago de Querétaro,

Qro, México. Tel.: +52 442 238 1057; E-mail: smondragonro@conacyt.mx.

INTRODUCTION

Neuronal protein inclusions are the hallmark of tauopathies [1]. Although the spectrum of tauopathies is vast (i.e., Alzheimer's disease (AD), Pick disease, corticobasal degeneration, progressive supranuclear palsy, argyrophilic grain disease, chronic traumatic encephalopathy, and aging-related tau astrogliopathy), abnormally phosphorylated tau protein (pTau) aggregation remains as their common feature [1–3]. Tauopathies include complex syndromes such as neurofibrillary tangle dementia, frontotemporal dementia, corticobasal syndrome, Richardson syndrome, parkinsonism, akinesia with gait freezing syndrome, and cerebellar ataxia [1, 3]; however, the current consensus argues that tauopathies are a continuum of asymptomatic prodromal stages leading to symptomatic dementia stages [4]. One neuronal signature of the prodromal tauopathy stages is the disruption of neuronal activity and connectivity between brain regions [4, 5]. Recent studies performed in rTg4510 transgenic mice, which overexpresses the mutant human Tau-P301L gene and recapitulate the pathology with accumulation of neurofibrillary tangles (NFTs), showed that: 1) pTau aggregation in the entorhinal cortex is sufficient to disrupt the coordination of local field potentials between its efferent regions [6]; 2) pTau inclusions are correlated with early weakening of electroencephalogram theta oscillations and coherent activity between the prefrontal cortex and hippocampal CA1-CA3 networks [7]; 3) intracellular pTau aggregation results in theta-gamma oscillations uncoupling [7]; and 4) by changing the activity patterns of a subpopulation of affected neurons, pTau aggregation reduces the activity of the neocortical network [8]. In line with these findings, in 5-week-old triple transgenic AD mice (3xTgAD), we recently reported that pTau at sites S396 and T231, which are located close to the microtubule domain (MD) region, accumulates within hippocampal pyramidal neurons and some parvalbumin-positive (PV+) interneurons correlating with alterations in the hippocampal theta activity [9]. Considering that pTau disrupts ongoing network activity, all the data pointed to the deleterious roles of pTau. However, non-deleterious roles for pTau have also been reported [9–12]. For example, it was reported that pTau inhibited amyloid- β induced neuronal death and offered protection from excitotoxicity [12]. This finding coincides with our previous report that pTau protein at MD sites prevents N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)-mediated

overexcitation [10, 11]. Indeed, we demonstrated that pTau at MD sites counteracts overexcitation by facilitating long-term depression (LTD) [10, 13]. Long-term potentiation (LTP) and LTD provide a compelling cellular model for learning and memory [14–18]. We also reported a dramatic reduction in 4-aminopyridine-induced seizure-like activity in 5-week-old 3xTgAD mice [9, 19] and found that this reduction in the induction of epileptiform activity correlated with pTau's MD accumulation in hippocampal pyramidal neurons and PV+ interneurons [9]. Further suggesting a non-deleterious role for pTau, in 9-week-old Tau-P301L mice, increased LTP in the dentate gyrus was observed in parallel with improved cognitive performance [20]. Altogether, the data suggested that pTau plays a non-deleterious role during the early stage of disease.

In the present work, we sought to study the role of pTau during the early stages (5 weeks of age) of tauopathy-driven neurodegeneration in the young rTg4510 mice that express the human tau isoform P301L [21]. In addition, we evaluated the early effects of pTau accumulation on neuronal function by questioning whether pTau accumulation induces structural and functional hippocampal changes.

Our results showed that very young rTg4510 mice have no detectable changes in either hippocampal-dependent tasks or locomotor activity. Interestingly, the hippocampal pyramidal neurons and some PV+ hippocampal interneurons accumulate pTau protein and this accumulation relates to changes in oscillatory activity recorded in the CA1/subiculum of very young rTg4510 mice. Importantly, enhanced learning and memory was associated with improved dendrites of granule neurons in the 5-week-old rTg4510 mice, despite a reduction in their somatic area.

METHODS

Animal strain

rTg4510 tetO-MAPT*P301L transgenic mice allow Tet-Off/Tet-On expression of a P301L mutant variant of human four-repeat microtubule-associated protein tau (Tau P301L), Jackson Labs. rTg4510 mice (male and female) between 30 and 35 days of age and age-matched non-transgenic (No-Tg) mice were housed in groups of 2–4 animals and maintained under a 12:12 h light cycle with water and food available *ad libitum*. Experimental procedures were approved by the Bioethics Committee of the Institute

of Neurobiology (NOM- 062-ZOO-1999/UNAM). The genotype of each animal was confirmed by PCR (Jackson Labs. Protocol Standard PCR, at the INB Proteogenomic Unit).

Immunohistochemistry

Mice were anesthetized with pentobarbital and transcardially perfused with PBS followed by 4% PFA. Brains were stored in fixative for 24 h at 4°C, then in a sucrose solution (30% in PBS) for three days at 4°C. Next, the brains were frozen using dimethylbutane and stored at -80°C. Brains were sliced coronally at 40 µm using a freezing microtome for light microscopy, or a vibrating microtome at 50 µm for fluorescence microscopy, and free-floating sections were stored in a preservative solution (3:3:4 glycerol:ethylene glycol:PBS) at -20°C, in preparation for immunohistochemistry. Washes in PBS preceded all steps except primary antibody addition. All steps were performed at room temperature unless otherwise specified. For immunofluorescence, sections were incubated for 2 h with PBS containing 1% normal goat serum, 0.25% Triton X-100, and 0.45% gelatin. Sections were incubated overnight at 4°C with pS396 (Invitrogen), AT180 (Thermo Fisher), Tau-5 (Sigma-Aldrich), and anti-PV+ (Synaptic Systems). Sections were incubated for 2 h with secondary antibody (Alexa 488-568 conjugated goat anti-rabbit at 1:1000 dilution, Invitrogen). Sections were then mounted on glass slides with Vectashield-DAPI Mounting Medium, Vector Labs. Fluorescence was visualized using an epifluorescence microscope (Axioplan 2, Zeiss). The hippocampal subfields were visualized with a 20X objective. A high magnification photomicrograph was obtained with a 40X objective.

Morphometry

Morphometric quantification in the areas was done on three microscopic fields from randomly chosen regions in the area of interest. Observations were conducted by bright field microscopy using a Zeiss microscope (Axioplan 2, Zeiss, Germany). Neuronal nuclei from the hippocampal region of interest were counted. Two to three slides were analyzed for each mouse. Cells in the region of interest were calculated per mouse and averaged per group. pTau-positive cells were identified and counted using 20x and 40x objective lenses. All cell counts were converted to a density value (pTau-positive cells/mm²) as previously described [2, 22, 23]. For counting, and when critical observations to identify pTau-positive cells

were necessary, low-magnification lenses were used. pTau-positive cells per square millimeter were registered from the CA1, CA2, CA3, DG, and subiculum. The fluorescent channel was imaged with an exposure time that was kept consistent across all slide imaging.

T maze

The T-maze task was designed to assess the cognitive ability of rodents in spontaneous alternation by allowing them to choose between two arms to explore a novel environment. This alternating choice depends on hippocampal functional integrity at the level of memory and learning [24–26]. For each trial, mice were placed into a T-shaped acrylic platform (40 cm long, 10 cm wide, and 15 cm high) located in a room with three space clues positioned in its walls. The T-maze consists of three basic zones: long arm (I) used as starting point, and two short arms for the alternative behavior (right and left). The long arm included a guillotine-like gate in its distal extreme used as the starting zone. The trial, which was repeated 3 times per day for 3 days, consisted of two phases: in the first phase, the mouse was placed in the start arm and allowed to choose one of the two short arms. The animal was left in the chosen arm for 20 s since the arm was blocked. For the second phase, the mouse was returned to the starting point and, once more, allowed to explore the maze and choose one of the two short arms. If the mouse did not choose an arm in either of the two phases of the task, the mouse was removed from the maze after 60 s and placed in its room box. This data was canceled from the analysis. The aim was to analyze whether the mouse would choose the same arm twice or alternate between arms. At the end of the study, the percentage of alternations between the novel and familiar arm was evaluated.

Nesting

The nesting test was performed to evaluate the general cognitive status of the animals by assessing the innate behavior of nest building [19, 27]. To do so, during the light period, 12 h prior to the night phase, each experimental subject was placed in an individual cage (26 cm × 48 cm × 20 cm) with a sawdust bed and a cotton square (5 × 5 cm). The quality of the nest made with the enrichment material (cotton) was evaluated according to the following scale: 0 = sawdust displacement by excavation, but intact cotton; 1 = sawdust movement to form a crater and minimal cotton shredding; 2 = clear sawdust crater formation and a substantial crumbling of the cotton

piece leading to the formation of the nest with a concave shape; 3= all the cotton material used for the construction of the nest, which has a spherical shape with a depth that completely covers the experimental subject.

Open field

The open field was used to assess exploratory behavior and locomotor activity. Every mouse was adapted to the room for 30 min and individually placed into the center of the open field (55 cm × 32.5 cm), followed by a single 5 min session test, with the experimenter out of its view. During the open field test, a regulated light intensity of 30 lux was used. The floor was marked to visualize the separation between the peripheral and the central areas. A digital camera videotaped the whole field. The videos obtained from the tests were analyzed using automated tracking software (SMART, Panlab SL, Barcelona, España). The parameters included distance traveled, the time spent in each area (periphery and center), number of crosses and vertical exploration, which allowed to evaluate anxiety, exploratory behavior, and hyperactivity in the experimental subjects [28, 29].

Novel object recognition test

Mice were transferred to the testing room and acclimated for at least 2 h. Mice were tested in an open field. The open field was placed in a homogeneously illuminated room (30 lux at the level of the open field). On the first day, mice were habituated to the testing arena for 30 min. On the second day, two identical objects were placed in the same chamber for 10 min. Four hours later, the objects were replaced with one exact replica of the original object and a novel object of different shape and texture. The mice were then allowed to explore the objects and the chamber for an equal amount of time. Positions of the familiar and novel object in the chamber were changed semi-randomly between testing of different mice but were kept constant between training and test sessions for any given mouse. Frequency of interactions with the object and time spent exploring each object were recorded for subsequent analysis, and recognition memory was assessed at the final trial [30]. Arena and object were cleaned after testing of each mouse.

Morphology analysis

For reconstruction of individual neurons, immunofluorescence images were imported into NeuroLucida

neuron reconstruction software (MBF Bioscience, Williston, VT). The entire dendritic structure and soma of each neuron were manually traced. Reconstruction data was subsequently imported into NeuroExplorer software (MBF Bioscience). The enclosed area of each soma was determined. Number of dendrites per cell and total dendritic length were measured using a Scholl analysis, also in the NeuroExplorer software. Cell counting was done using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Electrophysiology

Animals were anesthetized with urethane (1.0 g / kg, i.p) and subsequently mounted on a stereotaxic apparatus for the placement of the recording electrode. The tip of the electrode reached the following coordinates (with respect to Bregma and dura): AP = -0.2 mm, ML = ± 2.0, mm and DV = 1.9 mm. Local field potentials were recorded using borosilicate electrodes filled with aCSF (2–6 MΩ). Signals were recorded with a differential AC amplifier (A-M Systems) and filtered (high pass 1 Hz, low pass 10 KHz). With custom MATLAB software, field traces were analyzed using Fourier transform. Power spectra were calculated using the multitaper method (Chronux toolbox, i.e., using seven tapers). Integrated delta, theta, beta, and gamma power was calculated in 5 s bins over a period of 2–10 min, and the mean spectrum was taken as the grand mean of each animal. Theta power was measured in $\mu V^2/Hz$.

Data analysis

All data were compared statistically using GraphPad Prism 5 Windows, version 5.01 software. In all tests, values of $p < 0.05$ were considered significant unless otherwise specified. Bar graphs show experimental mean, with dispersion bars indicating standard error of the mean unless otherwise specified.

RESULTS

Hippocampal cells from young rTg4510 mice exhibit intracellular pTau accumulation

The immunohistochemical characterization of PN30-35 rTg4510 samples revealed the presence of intracellular pTau accumulation in neurons (Fig. 1). pTau (site S396) accumulation was detected in neurons from hippocampal CA1/CA2 (Fig. 1A, B),

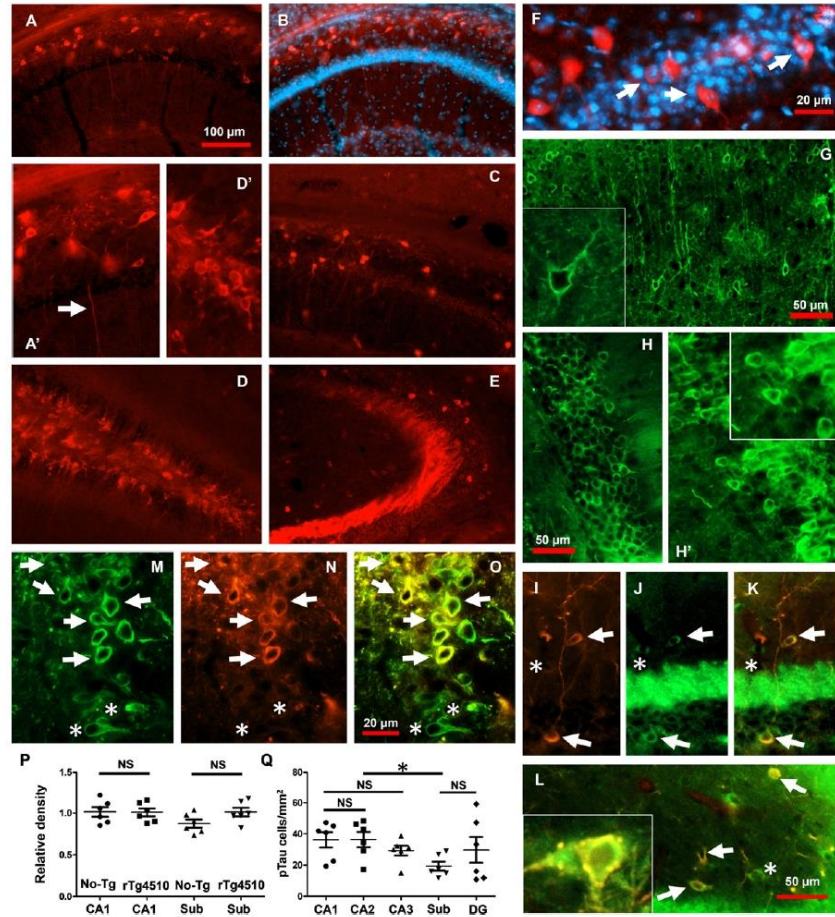


Fig. 1. Intracellular pTau into hippocampal cells in very young rTg4510 mice. pTau protein, detected through anti-S396 antibody, was found accumulating within pyramidal cells from the hippocampal CA1/CA2 area in the rTg4510 group (A, B). pTau accumulation was detected also within cells from CA1/Sub (C), DG (D), and CA3 in the rTg4510 group (E). Early pTau accumulation was detected in both dendrites (A', arrow) and somata (D'). pTau protein was clearly observed in the stratum pyramidale as revealed by DAPI (B, F). pTau at sites labeled by AT180 was found coexisting with neurons from cortex (G, see insert), and hippocampus (H and H', see insert). Hippocampal interneurons (I) accumulate pTau (I-L, arrows). AT180-positive PV + interneurons revealed punctate accumulation of pTau (L, see insert). Cells detected by total Tau (M) accumulate pTau (N, see merge in O). Density of nuclei in CA1 and subiculum was statistically similar between No-Tg and rTg4510 groups (P). Quantification of pTau-positive cells per mm² showed that almost all the hippocampal areas from young rTg510 exhibited the same number of pTau-positive cells per mm² (Q). The subiculum showed that the number of cells exhibiting pTau was significantly smaller than those exhibiting the other hippocampal areas (Q). The graph shows experimental mean and standard error of the mean. * denotes a significant difference between groups $p < 0.05$.

CA1/Subiculum (Fig. 1C), DG (Fig. 1D), and CA3 subfields (Fig. 1E). Of note, the number of pTau-positive neurons in PN30-35 rTg4510 mice was statistically increased when compared to PN30-35 No-Tg mice (No-Tg mean = 5.9 ± 0.82 cells/mm²; rTg4510 mean = 36.20 ± 4.9 cells/mm², unpaired 2-tailed *t* test, $t = 6.066$, $df = 10$, $p = 0.0001$, No-Tg: $n = 6$; rTg4510: $n = 6$). Increases in pTau levels were clearly detected in somata (Fig. 1A', D') and in the dendritic compartments of hippocampal cells (Fig. 1A', arrow). The stratum pyramidale, which contains the hippocampal principal excitatory neurons, was revealed by high accumulation of nuclear 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) labeling (Fig. 1B, F, blue-fluorescent stain). pTau accumulation was detected in principal neurons from the hippocampus (Fig. 1F, arrows). To further evaluate pTau at sites close to their MD, we evaluated the levels of pTau at sites T231-S235 labeled by AT180 (Fig. 1G, H, H'). The accumulation of AT180 was detected in cells from the PN30-35 rTg4510 samples (Fig. 1G, H, H', see inserts). Some PV + hippocampal interneurons (Fig. 1I) accumulate pTau (Fig. 1J, see merge in Fig. 1K and arrows in Fig. 1L). Additionally, non-positive PV cells accumulate pTau (see asterisk in Fig. 1K, L). Detailed analysis of pTau-positive PV + cells in PN30-35 rTg4510 mice revealed diffuse pTau-positive staining within the cytoplasm, sometimes comprising small punctate regions (Fig. 1L, see insert). Around 50% of the cells detected by total tau (Fig. 1M) accumulated pTau (Fig. 1N, see arrows in Fig. 1O). Some cells detected by total tau antibody did not accumulate pTau (see asterisk in Fig. 1M-O). Importantly, the density of nuclei in CA1 and subiculum was statistically similar between groups (CA1_{No-Tg} versus CA1_{rTg4510} unpaired 2-tailed *t* test, $t = 0.06355$, $df = 10$, $p = 0.9506$; Mann-Whitney $U = 17$, $p = 0.9372$, Sub_{No-Tg} versus Sub_{rTg4510} unpaired 2-tailed *t* test, $t = 1.932$, $df = 10$, $p = 0.0821$; Mann-Whitney $U = 8$, $p = 0.132$, Fig. 1P). When we analyzed the number of pTau-positive neurons, we found that pTau cells per mm² were statistically similar between hippocampal areas (CA1 mean = 36.2 ± 13.2 cells/mm²; CA2 mean = 36.37 ± 12.7 , CA3 mean = 29.39 ± 4.84 , DG mean = 29.74 ± 22.56 ; CA1 versus CA2 unpaired 2-tailed *t* test, $t = 0.0258$, $df = 10$, $p = 0.9799$; Mann-Whitney $U = 17$, $p = 0.9372$, CA1 versus CA3 unpaired 2-tailed *t* test, $t = 1.161$, $df = 10$, $p = 0.2726$; Mann-Whitney $U = 10$, $p = 0.2403$, CA1 versus DG unpaired 2-tailed *t* test, $t = 0.6702$, $df = 10$, $p = 0.5179$; Mann-Whitney $U = 13.5$, $p = 0.5211$, Fig. 1Q). A

planned comparison between Subiculum and CA1, CA2, and CA3 areas revealed lower levels of pTau-positive neurons per mm² in the hippocampus (Sub mean = 19.78 ± 5.72 cells/mm², Sub versus CA1 unpaired 2-tailed *t* test, $t = 2.957$, $df = 10$, $p = 0.0144$; Mann-Whitney $U = 4$, $p = 0.026$, Sub versus CA2 unpaired 2-tailed *t* test, $t = 3.015$, $df = 10$, $p = 0.013$; Mann-Whitney $U = 3.5$, $p = 0.0247$, Sub versus CA3 unpaired 2-tailed *t* test, $t = 2.344$, $df = 10$, $p = 0.0411$; Mann-Whitney $U = 5$, $p = 0.0446$, Sub versus DG unpaired 2-tailed *t* test, $t = 1.182$, $df = 10$, $p = 0.2644$; Mann-Whitney $U = 15$, $p = 0.6879$, Fig. 1Q).

Overall, and consistent with our previous findings [9], we showed that pTau at MD sites increases at very initial stages of tauopathy progression. Additionally, pTau at MD sites is expressed in different neuronal types in the entire hippocampus of the very young rTg4510 mice.

Working memory and hippocampal dependent function

Spatial working memory was analyzed through spontaneous alternation in the hippocampus-dependent T-maze [24–26]. In this test, control mice showed a choice accuracy of $71.30 \pm 5.54\%$ (Fig. 2A), whereas the very young rTg4510 achieved a choice accuracy of $60.10 \pm 7.49\%$ (Fig. 2A). The statistical comparison revealed no significant differences between genotypes (unpaired 2-tailed *t* test, $t = 1.202$, $df = 18$, $p = 0.2449$; Mann-Whitney $U = 36.5$, $p = 0.3174$, No-Tg: $n = 10$; rTg4510: $n = 10$, Fig. 2A). To further explore hippocampal-dependent function, we performed the innate nesting test [9, 19, 27]. Innate nesting is significantly reduced upon hippocampal cytotoxic lesions and can be evaluated in animals at early post-natal developmental ages [9, 19, 27]. Consistent with the T-maze test, the statistical comparison of nesting behavior revealed no significant differences between genotypes (No-Tg = 2.05 ± 0.21 nesting rating and rTg4510 = 1.65 ± 0.15 nesting rating; unpaired 2-tailed *t* test, $t = 1.518$, $df = 18$, $p = 0.1464$; Mann-Whitney $U = 31$, $p = 0.1466$, No-Tg: $n = 10$; rTg4510: $n = 10$, Fig. 2B). To identify memory deficits, we tested mice in the novel object recognition test [30]. Surprisingly, PN30-35-day-old rTg4510 mice spent significantly more time with the novel object than with the familiar one (unpaired 2-tailed *t* test, $t = 3.234$, $df = 16$, $p = 0.0052$; Mann-Whitney $U = 9$, $p = 0.0044$, No-Tg: $n = 8$; rTg4510: $n = 10$, Fig. 2C).

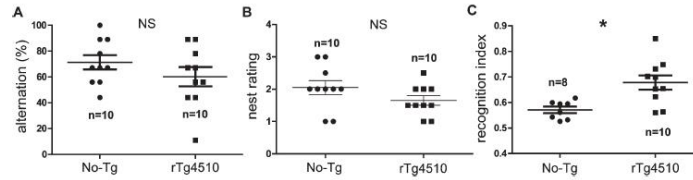


Fig. 2. Working memory and nesting are not affected in the young rTg4510 mice. Alternation in the T-maze (working memory) showed no significant differences between No-Tg and rTg4510 mice (A). The nest rating revealed no significant differences between genotypes (B). rTg4510 mice spent significantly more time with the novel object than with the familiar one (C). All graphs show experimental mean and standard error of the mean. NS denotes no significant difference between groups $p > 0.05$ and * denotes a significant difference between groups $p < 0.05$.

In sum, the young rTg4510 mice showed no signs of hippocampal function deficit at the very early developmental age of PN30-35. Conversely, PN30-35-day-old rTg4510 mice displayed improved memory.

Motor activity and exploration in the young rTg4510 mice

Motor activity and exploration were assessed in the open-field arena [28, 29]. The PN30-35 rTg4510 mice were similarly active to age-matched No-Tg mice (Fig. 3A, B, mouse trajectories: black lines). During the 5 min of open-field spontaneous exploration, the total distance traveled showed no significant differences between No-Tg and rTg4510 mice (No-Tg = 2250 ± 125.1 and rTg4510 = 2314 ± 157.4 cm, unpaired 2-tailed t test, $t = 0.06893$, $df = 22$, $p = 0.9457$; Mann-Whitney $U = 71$, $p = 0.9770$, No-Tg: $n = 10$; rTg4510: $n = 10$, Fig. 3C). The total number of crosses into the center area of the open-field arena showed no significant difference between No-Tg and rTg4510 (No-Tg = 54.30 ± 4.81 and rTg4510 = 60.20 ± 3.83 ; unpaired 2-tailed t test, $t = 0.9580$, $df = 18$, $p = 0.3508$; Mann-Whitney $U = 36.5$, $p = 0.3254$, No-Tg: $n = 10$; rTg4510: $n = 10$, Fig. 3D). However, the rTg4510 mice spent significantly less time in the center of the arena when compared to family age-matched No-Tg mice (No-Tg = 128.5 ± 4.97 sec and rTg4510 = 104.5 ± 9.89 s; unpaired 2-tailed t test, $t = 2.167$, $df = 18$, $p = 0.0439$, Mann-Whitney $U = 28$, $p = 0.1051$, No-Tg: $n = 10$; rTg4510: $n = 10$, Fig. 3E). Finally, regarding rearing display movements, both genotypes showed no significant differences in the number of rearing (No-Tg = 192.3 ± 2.31 and rTg4510 = 189.6 ± 3.00 ; unpaired 2-tailed t test, $t = 0.7296$, $df = 15$, $p = 0.4769$; Mann-Whitney $U = 27.5$, $p = 0.4932$, No-Tg: $n = 10$; rTg4510: $n = 7$, Fig. 3F).

Although the very young rTg4510 mice spent less time in the center of the open-field arena, their motor activity and motor coordination showed no alterations.

Hippocampal morphology in the young rTg4510 mice

To evaluate potential morphological changes, we investigated structural characteristics in several hippocampal subfields of rTg4510 mice in direct comparison with No-Tg mice of the same age. We focused the structural analysis on cells characterized by pTau accumulation (Fig. 4). Parameters such as the area of individual soma and number of dendritic ramifications were evaluated (Fig. 4). The somatic area (μm^2) of the pyramidal cells was significantly decreased in the PN30-35 rTg4510 mice (No-Tg = $14.29 \pm 3.47\%$ and rTg4510 = $6.66 \pm 0.98\%$; unpaired 2-tailed t test, $t = 2.795$, $df = 20$, $p = 0.0112$; Mann-Whitney $U = 23$, $p = 0.0409$, No-Tg: $n = 7$; rTg4510: $n = 15$, Fig. 4A). In accordance with the findings in the pyramidal layer, the somatic area of DG cells was significantly smaller in the PN30-35 rTg4510 mice (No-Tg = $20.00 \pm 4.14\%$ and rTg4510 = $11.11 \pm 0.80\%$; unpaired 2-tailed t test, $t = 2.790$, $df = 12$, $p = 0.0163$; Mann-Whitney $U = 9$, $p = 0.0829$, No-Tg: $n = 7$; rTg4510: $n = 9$, Fig. 4B). Surprisingly, dendrites per cell in the DG cell layer (Fig. 4C) were significantly higher in the PN30-35 rTg4510 mice (No-Tg = 1.8 ± 0.2 and rTg4510 = 2.66 ± 0.24 ; unpaired 2-tailed t test, $t = 2.750$, $df = 26$, $p = 0.0107$; Mann-Whitney $U = 26.5$, $p = 0.0003$, No-Tg: $n = 16$; rTg4510: $n = 12$, Fig. 4D).

Although the area of individual soma was decreased in the PN30-35 rTg4510 mice, the dendrites per cell in the DG were significantly increased in the PN30-35 rTg4510 mice.

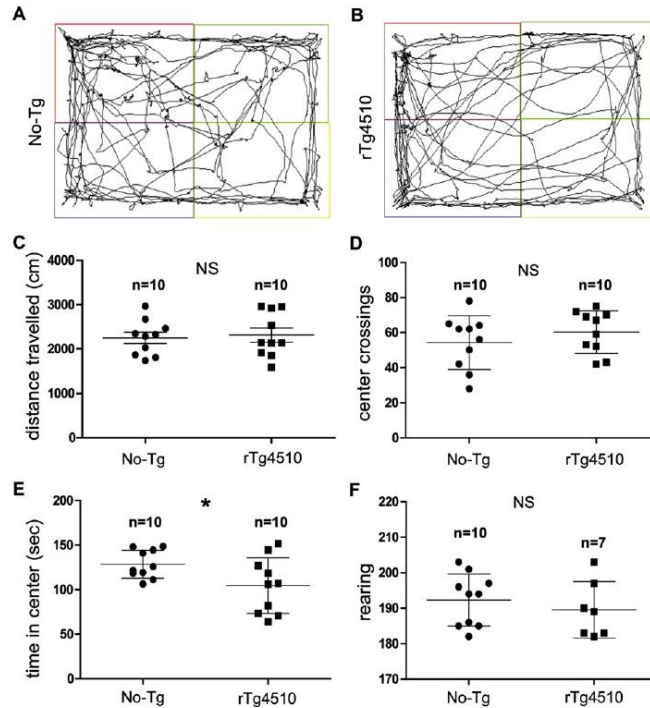


Fig. 3. Exploration of motor activity showed no alterations in the young rTg4510 mice. Representative trajectories of No-Tg (A) and rTg4510 mice (B). The total distance traveled in the open field arena showed no significant changes between No-Tg and rTg4510 groups (C). The total number of squares crossed in the open field arena showed no significant difference between No-Tg and rTg4510 mice (D). In contrast, the rTg4510 spent significantly less time in the center when compared to No-Tg mice (E). Rearing display showed no significant differences between No-Tg and rTg4510 groups (F). All graphs show experimental mean and standard error of the mean, NS denotes no significant difference between groups $p > 0.05$ and * denotes a significant difference between groups $p < 0.05$.

Changes in hippocampal network activity in young rTg4510 mice

Our previous findings have suggested that very early accumulation of intracellular pTau in hippocampal neurons could have an impact on their network activity [9, 10]. To further evaluate this possibility, we studied the intrinsic spontaneously ongoing oscillatory activity in the hippocampus of the PN30-35-days-old rTg4510 mice *in vivo* (Fig. 5A). In line with our previous report [9, 19, 31], population activity from No-Tg animals showed rhythmic theta activity in the hippocampal area (Fig. 5B). Filtered traces further confirmed the presence of

rhythmic hippocampal network activity at theta band-frequency (3–10 Hz) and gamma-band frequencies (> 25 Hz) (Fig. 5B, lower traces). Similarly, hippocampal network activity recorded from the young rTg4510 mice displayed rhythmic activity at theta-band frequency (3–10 Hz) and gamma band-frequencies (> 25 Hz) (Fig. 5C, see lower traces). The power spectrum analysis revealed a stable power theta band activity with a mean frequency of 8.41 ± 0.52 Hz in the No-Tg group (Fig. 5D) and 7.13 ± 0.16 Hz in the young rTg4510 mice (Fig. 5D). Statistical comparison between groups revealed a significant decrease in hippocampal theta frequency in the young rTg4510 mice when compared to

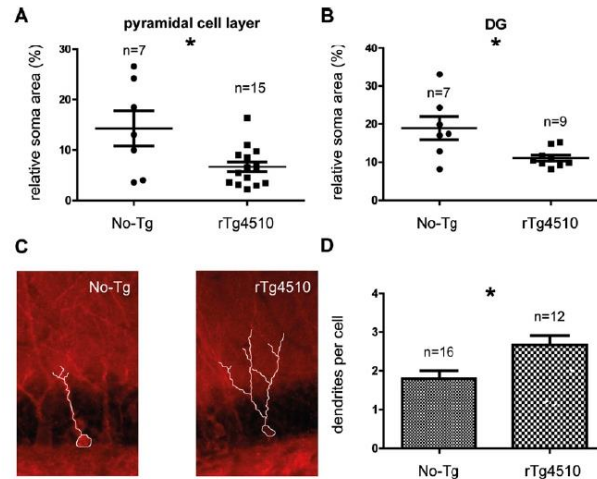


Fig. 4. Hippocampal morphology in the young rTg4510 mice. The somatic area of the pyramidal cell layer (A) and DG layer (B) were significantly increased in the young rTg4510 mice. Examples of cells in the DG are shown (C). The dendrites per cell in the DG layer were significantly increased in the rTg4510 mice (D). All graphs show experimental mean and standard error of the mean, * denotes a significant difference between groups $p < 0.05$.

the family-related No-Tg mice (unpaired 2-tailed t test, $t = 2.670$, $df = 15$, $p = 0.0175$; Mann-Whitney $U = 9$, $p = 0.0097$, No-Tg: $n = 7$; rTg4510: $n = 10$, Fig. 5D). Regarding the relative power of the oscillatory activity, no significant differences were observed in the relative power at delta band (1–3 Hz) between groups (No-Tg = $25.51 \pm 2.38\%$ and rTg4510 = $21.11 \pm 3.52\%$; unpaired 2-tailed t test, $t = 1.07$, $df = 16$, $p = 0.3004$; Mann-Whitney $U = 28$, $p = 0.3154$, No-Tg: $n = 10$; rTg4510: $n = 8$, Fig. 5E). However, a significant reduction was observed in the relative theta power in young rTg4510 animals when compared to the No-Tg group (No-Tg: $43.39 \pm 1.31\%$ and rTg4510: $38.65 \pm 1.21\%$; unpaired 2-tailed t test, $t = 2.594$, $df = 16$, $p = 0.0196$; Mann-Whitney $U = 13$, $p = 0.0155$, No-Tg: $n = 10$; rTg4510: $n = 8$, Fig. 5F). Moreover, statistical analysis of young rTg4510 exhibited a significant increase in slow and fast gamma power (slow gamma (25–45 Hz): No-Tg = $4.51 \pm 0.58\%$ and rTg4510 = $7.37 \pm 1.35\%$; unpaired 2-tailed t test, $t = 2.077$, $df = 16$, $p = 0.0542$; Mann-Whitney $U = 21$, $p = 0.1011$, No-Tg: $n = 10$; rTg4510: $n = 8$, Fig. 5G, and fast gamma (45–250 Hz): No-Tg = $0.83 \pm 0.12\%$ and rTg4510 = $2.35 \pm 0.54\%$; unpaired 2-tailed t test,

$t = 3.036$, $df = 16$, $p = 0.0079$; Mann-Whitney $U = 5$, $p = 0.0009$, No-Tg: $n = 10$; rTg4510: $n = 8$, Fig. 5H).

Summarizing, the electrophysiological characterization demonstrated changes in the population rhythmic activity, at the theta and gamma frequency bands, in the CA1/subiculum of PN30-35 rTg4510 mice.

DISCUSSION

In this study, we assessed the impact of early pTau accumulation on neuronal function in the hippocampus. First, we showed that in rTg4510 mice pTau (sites S396/T231/S235) accumulates at an early age (PN30-35) in different neurons from the hippocampus including principal cells and PV + interneurons (Fig. 1). In line with our findings, hyperphosphorylated tau at sites T231/S235 (phospho-epitope AT180), was observed in the CA1 pyramidal neuron layer of rTg4510 mice at one and two months of age [32]. Besides, hyperphosphorylated tau at sites S400, S404, and S412 was reported in rTg4510 mice at 6 weeks of age [33]. Importantly, pTau accumulation was observed prior to changes in hippocampal density (Fig. 1), indicating that tau hyperphosphorylation

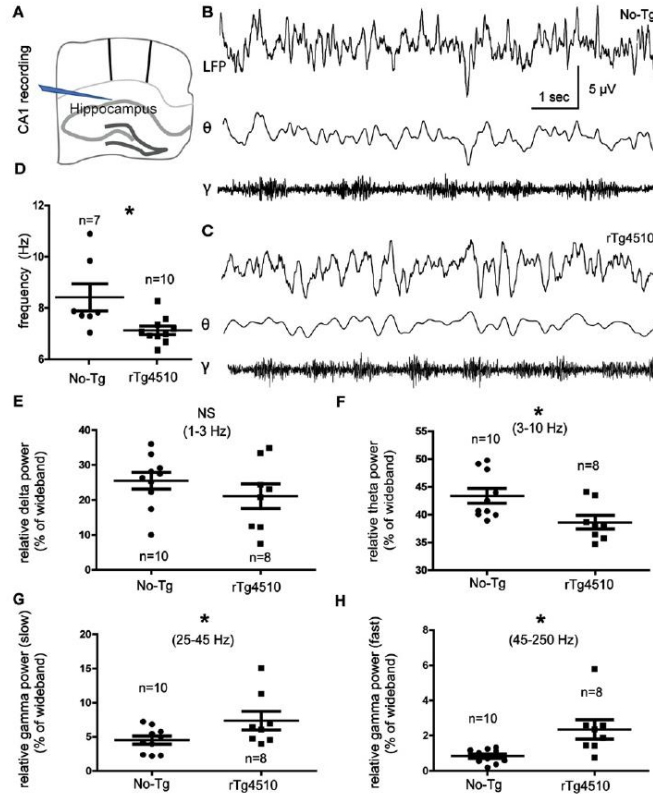


Fig. 5. Oscillatory activity is altered in the hippocampus of very young rTg4510 mice. *In vivo* recording site within the hippocampus (A). Representative traces of spontaneous field activity recorded in the hippocampus of No-Tg (B, upper trace) and rTg4510 mice (C, upper trace). Same recordings are presented after being filtered for the theta band frequency (middle traces) and gamma band frequency (lower traces). The power spectrum analysis revealed significant decrease in hippocampal theta frequency in the young rTg4510 mice when compared to the family-related No-Tg mice (D). The power spectrum analysis showed no significant changes in the relative power of the delta band (1–3 Hz) between No-Tg and rTg4510 groups (E). Power spectrum analysis of the theta band showed a significant reduction in the relative power (F), and a significant increase in the relative power of the slow gamma band (G) and fast gamma band (H) of the rTg4510 animals. All graphs show experimental mean and standard error of the mean, NS denotes no significant difference between groups $p > 0.05$ and * denotes a significant difference between groups $p < 0.05$.

occurs before cell loss. Supporting these findings, neuronal loss in rTg4510 mice was reported after five months of age [34]. Conversely, hyperphosphorylated tau at sites S199/S202/T205 (phospho-epitope AT8) was not present in rTg4510 mice at 6 weeks of age [33]. Altogether, data in young rTg4510 mice showed that hyperphosphorylation of tau protein at

the carboxyl terminus (tau's MD region) is among the earliest events, and it occurs before the classical fibrillar structure (NFTs) appears. Similarly, this sequence of hyperphosphorylation events was observed in patients with AD and related disorders [2, 3]. Of direct relevance, these disorders are characterized by synaptic dysfunction in the early phases

of pathogenesis [35, 36]. In the same regard, several studies reported age-dependent synaptic alterations in rTg4510 mice [37–40]. Mechanistically, increases of phosphorylation in sites near tau's MD reduced tau binding ability, therefore perturbing the synaptic and behavior response [10, 36, 41–43]. Nonetheless, we showed that this early neuronal pTau expression and accumulation does not impair hippocampal and motor behavior in young rTg4510 mice (Figs. 2 and 3). On the contrary, young rTg4510 mice showed a significant improvement in cognitive performance in the object recognition task (Fig. 2). In support of our findings, spatial memory deficits in rTg4510 mice were first detected at 4 months of age [44]. Accordingly, it was demonstrated that the P301L mice, an rTg4510 homologous model, did not suffer either cognitive or motor deficits at the early age of 10 weeks [20]. Further, P301L mice showed increased LTP in the DG correlated with improved cognitive performance [20]. This improved cognitive performance in early stages of the P301L mice model was related to the absence of marked pTau accumulation and the absence of morphological changes [20]. In contrast, our data revealed steady pTau accumulation associated with the enhanced cognitive performance and absence of motor deficits in young rTg4510 mice. These findings are in line with the recently reported steady accumulation of pTau related to the absence of cognitive impairment in the 5-week-old 3xTg-AD model [9].

These new findings in the young rTg4510 model, along with the well-characterized cognitive and motor deficits starting at 4 months of age [44–46], support the non-deleterious role for pTau during the early stage of disease.

In normal neuronal process tau is involved in the formation of long cytoplasmic extensions that will become the axon and the dendrites [47, 48]. Tau facilitates tubulin assembly, stabilizes polymerized microtubules, and nucleates microtubules [49]. Since the tau binding site on tubulin overlaps with that for other proteins like the molecular motor kinesin, tau also influences processes like axonal transport [50]. In sum, tau protein participates in maintaining the neuron's shape and the neural transmission [48]. Additionally, tau can bind to proteins such as spectrin, actin, phosphatases like PPI and PP2A, kinases like CDK5, GSK3 and Fyn tyrosine kinase, and synaptic proteins like postsynaptic density protein-95 (PSD-95) [10, 43, 48, 51–53]. Tau also participates in the most studied cellular model of memory, LTP and LTD [10, 54]. Of relevance, tau phosphorylation is

the predominant way in which tau function can be regulated [10, 12, 48, 55]. For example, tau phosphorylation at Thr231 and Ser262 affects microtubule binding [53]. In the same regard, tau phosphorylation at sites labeled by PHF-1 and AT180 affects the interaction between tau and Fyn and between tau and PSD-95 [10, 11, 43]. Thus, the phosphorylation of tau protein also influences the distribution of this protein [56]. For instance, tau phosphorylation in its carboxy-terminal domain is mainly found in the distal axonal region and dendrites [56]. Additionally, hyperphosphorylated tau has been described in extracts of both normal and AD tissue [2, 10, 57, 58]. Altogether, current data along with the data reported in this study support the non-deleterious role for hyperphosphorylated tau during the early stage of disease.

Regarding the dominant tau hypothesis, pTau is critical for cognitive decline in tauopathies [1, 41–43]. Tau becomes abnormally phosphorylated, dissociates from microtubules, aggregates into NFTs, and translocates from the axon to the dendritic spines, causing synaptic and network dysfunction [8, 43]. Pathologically, the progressive increase and accumulation of pTau have been associated with neuronal atrophy, proposed to be a result of synaptic degradation and neuronal loss [34, 59]. Mechanistically, it was demonstrated that pTau accumulates in the somatodendritic compartment of neurons and has a dendritic function in the postsynaptic targeting of the Src kinase Fyn [43, 60]. Phosphorylation of the NMDAR by Fyn promotes its interaction with the scaffolding PSD-95, leading to excitotoxic downstream signaling and synaptic alterations [43].

Aiming to address the potential morphological correlates of the increased pTau in the hippocampus of the young rTg4510 mice, we evaluated structural changes in hippocampal subfields (Fig. 4). Despite the reduction in area of individual soma in the hippocampus, no dendritic pathology was detected (Fig. 4). Indeed, an increased number of dendrites per cell in granule neurons was found (Fig. 4). Contrary to the dominant tau hypothesis, an increased number of dendrites and significant improvement in cognitive performance support the non-deleterious role for hyperphosphorylated tau during the early stage of disease in the young rTg4510 mice.

Considering that dendrites are complex structures consisting of a dense network of cytoskeletal, transmembrane and scaffolding molecules, and surface receptors [61], this last observation suggests an interesting role for pTau in dendritic morphology. Giving support to this hypothesis, it was reported that the

PACSIN1-family of cytoplasmic adapter protein is a tau binding partner in regulating microtubule dynamics and forming axonal plasticity [62]. Interestingly, PACSIN1 blockade results in impaired axonal elongation and a higher number of primary axonal branches in mouse dorsal root ganglia neurons, which is induced by reduced tau microtubule binding ability and accumulation in the central domain of growth cones [62]. As previously mentioned, is widely known that tau's affinity for microtubules is actively regulated by phosphorylation [41, 42]. Thus, an early increase in phosphorylation levels of dendritic tau disrupts the interaction between tau and dendritic proteins [10, 41–43]. Similarly, we believe that the higher number of dendritic branches in young rTg4510 mice could serve as a compensatory mechanism exerted by pTau during early stages of disease progression. This observation contributes to the hypothesis that pTau protein during early stages of disease progression could be involved in neuroprotection and neural function improvement, rather than being exclusively involved in neurodegeneration [9–12, 20].

In sum, the current data demonstrated that pTau increases are not correlated with cognitive or motor impairment, or with major morphological alterations. In contrast, pTau increases were correlated with a rise in the number of dendrites in DG cells and improved cognition. Therefore, tau mutation and early pTau accumulation per se are not critical for cognitive and motor decline.

Non-fibrillar pTau and neuronal activity in the young rTg4510 mice

Despite the absence of cognitive and locomotor alterations in early AD development, we have previously reported changes in the hippocampal network (oscillatory activity) of 5-week-old J20 and 3xTgAD mice [9, 31, 63]. The two transgenic mouse models are characterized by accumulation of pTau at MD sites during early stages of disease [9, 64].

Aiming to evaluate ongoing activity in the young anesthetized rTg4510 mice, we assessed their hippocampal oscillatory activity (Fig. 5). During slow-wave sleep (SWS) and under anesthesia, the membrane potential spontaneously transitions between the hyperpolarized silent down state and the depolarized-up state, from which action potential arises [8, 65]. Therefore, anesthesia serves as a model for SWS that allows the evaluation of spontaneous ongoing activity of the neurons within an intact network [8, 66].

Here we showed that hippocampal ongoing activity recorded in the CA1/subiculum from PN30-35 rTg4510 mice was altered before any cognitive and locomotor deficits (Fig. 5). Changes include slower frequency oscillations in the theta band, reduced power in the lower frequency bands (theta), and increased power in the gamma band (Fig. 5). It is worth mentioning that electrophysiological studies in rTg4510 mice have mostly been performed in mice over 7 months old [67]. Regardless, at 7 to 8 months of age, when rTg4510 mice exhibit advanced pTau deposition (NFTs) and progressive neurodegeneration, theta band recorded in the hippocampal CA1 was also decreased [68]. Hypothesizing that pTau aggregates (NFTs) are the seminal event for alterations in network oscillations, the inoculation of fibrillar aggregates of human tau fragments containing the four-microtubule-binding repeat domains in 3-month-old P301L mice reduced the power of the hippocampal CA1 theta and delta bands [7]. In agreement, by expressing P301L human tau in adult rats, theta activity showed significantly lower amplitude values when directly compared to the control, while gamma activity showed higher amplitude values [6], which is what we found here.

Overall, slower frequency oscillations and reduced power in the theta band, along with pTau accumulation in principal cells and PV+interneurons suggested that early stages of tauopathy were mainly characterized by a reduction in hippocampal excitability. In this regard, our previous work demonstrated that increases in pTau in principal cells and PV+interneurons reduced hippocampal excitability in 5-week-old 3xTgAD mice [9, 19]. Thus, we demonstrated that increases in pTau at MD sites prevent seizure activity in 5-week-old 3xTgAD mice [9, 19]. In addition, we reported that increases in sites T231, S235, S396, and S404 reduced the susceptibility to excitotoxicity by perturbing the PSD-95-tau-Fyn synaptic complex, therefore promoting the synaptic response to LTD [10, 11]. A patch-clamp of hippocampal CA1 neurons from rTg4510 mice showed a more depolarized threshold for action potential generation and a reduction in firing, further supporting the role of pTau in reducing neuronal excitability [32]. Besides, reduced neuronal excitability results from the relocation of the axon initial segment down the axon in a pTau-dependent manner [32]. We therefore propose that a reduction in hippocampal excitability caused by an increase in pTau contributes to the remodeling in hippocampal activity.

Aside from the control of neuron excitability, an alternative hypothesis suggests that regardless of whether the neurons bear NFTs, non-fibrillar pTau presence is sufficient to alter neuronal activity [8, 9]. In this regard, it was demonstrated that non-fibrillar pTau reduces the activity of single neocortical pyramidal cells and the neocortical network in 3- to 5-month-old rTg4510 mice [8]. Thus, it is possible that intracellular pTau affecting only a fraction of the neurons escalates to a disruption of the entire neuronal network [8]. Supporting this hypothesis, we showed that non-fibrillar pTau accumulates in pyramidal neurons and in some PV+interneurons from one-month-old 3xTg-AD mice [9]. Additionally, intracellular pTau affecting a fraction of the neurons correlated with changes in oscillatory activity [9]. Because the harmonious activity between pyramidal neurons and PV + interneurons is mainly responsible for the generation and maintenance of oscillatory rhythms [69], we proposed that early non-fibrillar pTau accumulation in young rTg4510 mice is greatly responsible for the electrophysiological alterations describe here. Thus, these early alterations preceded cognitive and motor deficits, defining the prodromal stage of tauopathies. Additionally, we believe that the changes recorded in the young rTg4510 mice share a similar mechanism to that of young 3xTgAD mice and young J20 mice, in which pTau affects a fraction of pyramidal cells and PV + interneurons [9, 13, 31].

Overall, the findings in this report showed that: 1) Tau mutation and early non-fibrillar pTau accumulation per se are not critical for cognitive and motor decline, 2) the presence of early non-fibrillar pTau accumulation correlated with improved cognition and improved dendritic morphology in DG cells, suggesting a positive role for pTau, at least during very early stages of tauopathy development, 3) intracellular pTau affecting only a fraction of the neurons might escalate to a disruption of the entire neuronal network, and 4) the recorded electrophysiological changes become a potential biomarker for detecting the prodromal stage of tauopathies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jessica Gonzalez Norris for proofreading. We thank the following facilities from INB: Proteogenomic Facility Unit (Adriana Gallardo), Microscopy Facility Unit (Nydia Hernández-Rios), Behavioral Analysis Core Facility (Deisy Gasca), and Vivarium Facility (Alejandra Castilla and Martín

García). We also thank Benito Ordaz-Sánchez and Azucena Aguilar-Vázquez for technical support.

This research was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (grant numbers 269021, 319863 and A1-S-7540) and by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, México (grant number AG200521). S M-R was awarded a Cátedra position by CONACYT, México.

Authors' disclosures available online (<https://www.j-alz.com/manuscript-disclosures/21-5186r2>).

REFERENCES

- [1] Kovacs GG (2017) Tauopathies. *Handb Clin Neurol* **145**, 355-368.
- [2] Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Luna-Muñoz J, Acevedo-Aquino MC, Williams S (2014) Phosphorylation of tau protein at sites Ser (396-404) is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol* **40**, 121-135.
- [3] Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Pena-Ortega F, Williams S (2017) Tau, amyloid beta and deep brain stimulation: Aiming to restore cognitive deficit in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **14**, 40-46.
- [4] Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S (2016) Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement* **12**, 292-323.
- [5] Pievani M, Filippini N, Van den Heuvel MP, Cappa SF, Frisoni GB (2014) Brain connectivity in neurodegenerative diseases from phenotype to proteinopathy. *Nat Rev Neurosci* **10**, 620-633.
- [6] Tanninen SE, Nourizabari B, Morrissey MD, Bakir R, Dayton RD, Klein RL, Takehara-Nishiuchi K (2017) Entorhinal tau pathology disrupts hippocampal-prefrontal oscillatory coupling during associative learning. *Neurobiol Aging* **58**, 151-162.
- [7] Ahnaou A, Moechars D, Raeymaekers L, Biermans R, Manyakov NV, Bottelbergs A, Wintmolders C, Van Kolen K, Van De Castele T, Kemp JA, Drinkenburg WH (2017) Emergence of early alterations in network oscillations and functional connectivity in a tau seeding mouse model of Alzheimer's disease pathology. *Sci Rep* **7**, 14189.
- [8] Menkes-Caspi N, Yamin HG, Kellner V, Spiers-Jones TL, Cohen D, Stern EA (2015) Pathological tau disrupts ongoing network activity. *Neuron* **85**, 959-966.
- [9] Mondragón-Rodríguez S, Salas-Gallardo A, González-Pereyra P, Martín Macías M, Ordaz B, Peña-Ortega F, Aguilar-Vázquez A, Orta-Salazar E, Díaz-Cintra S, Perry G, Williams S (2018) Phosphorylation of Tau protein correlates with changes in hippocampal theta oscillations and reduces hippocampal excitability in Alzheimer's model. *J Biol Chem* **293**, 8462-8472.
- [10] Mondragón-Rodríguez S, Trillaud-Doppia E, Dudilot A, Bourgeois C, Lauzon M, Leclerc N, Boehm J (2012) Interaction of endogenous tau with synaptic proteins is regulated by NMDA-receptor dependent tau phosphorylation. *J Biol Chem* **287**, 32040-32053.
- [11] Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Zhu X, Boehm J (2012) Amyloid beta and tau proteins as therapeutic targets for

- Alzheimer's disease treatment: Rethinking the current strategy. *Int J Alzheimers Dis* **2012**, 630182.
- [12] Ittner A, Chua SW, Bertz J, Volkerling A, van der Hoven J, Gladbach A, Przybyla M (2016) Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid- β toxicity in Alzheimer's mice. *Science* **354**, 904–908.
- [13] Mondragón-Rodríguez S, Salgado-Burgos H, Peña-Ortega F (2020) Circuitry and synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: A new Tau hypothesis. *Neural Plast* **2020**, 2960343.
- [14] Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC (1993) An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science* **261**, 1051–1055.
- [15] Collingridge GL, Isaac JTR, Wang YT (2004) Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **5**, 952–962.
- [16] Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT (2010) Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci* **11**, 459–473.
- [17] Lüscher C, Malenka RC (2012) NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a005710.
- [18] Connor SA, Wang YT (2016) A place at the table: LTD as a mediator of memory genesis. *Neuroscientist* **22**, 359–371.
- [19] Mondragón-Rodríguez S, Ordaz B, Orta-Salazar E, Diaz-Cintra S, Peña-Ortega F, Perry G (2020) Hippocampal unicellular recordings and hippocampal-dependent innate behaviors in an adolescent mouse model of Alzheimer's disease. *Bio Protoc* **10**, e3529.
- [20] Boekhoorn K, Terwel D, Biemans B, Borghgraef P, Wiegert O, Ramakers GJA, de Vos K, Krugers H, Tomiyama T, Mori H, Joels M, van Leuven F, Lucassen PJ (2016) Improved long-term potentiation and memory in young tau-P301L transgenic mice before onset of hyperphosphorylation and tauopathy. *J Neurosci* **26**, 3514–3523.
- [21] Alix de Calignon A, Spires-Jones TL, Pitstick R, Carlson GA, Hyman BT (2009) Tangle-bearing neurons survive despite disruption of membrane integrity in a mouse model of tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 757–761.
- [22] Mukaetova-Ladinska EB, Harrington CR, Roth M, Wischik CM (1993) Biochemical and anatomical redistribution of tau protein in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **143**, 565–578.
- [23] Mondragón-Rodríguez S, Mena R, Binder LI, Smith MA, Perry G, Garcia-Sierra F (2008) Conformational changes and cleavage of tau in Pick bodies parallel the early processing of tau found in Alzheimer pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* **34**, 62–75.
- [24] Lalonde R (2002) The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev* **26**, 91–104.
- [25] Dember WN, Fowler H (1958) Spontaneous alternation behavior. *Psychol Bull* **55**, 412–427.
- [26] Deacon RMJ, Rawlins JNP (2006) T-maze alternation in the rodent. *Nat Prot* **1**, 7–12.
- [27] Deacon RMJ (2006) Assessing nest building in mice. *Nat Protoc* **1**, 1117–1119.
- [28] Salgado-Puga K, Prado-Alcalá RA, Peña-Ortega F (2015) Amyloid β enhances typical rodent behavior while it impairs contextual memory consolidation. *Behav Neurol* **2015**, 526912.
- [29] Seibenhener ML, Wooten MC (2015) Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp* **96**, doi:10.3791/52434
- [30] Lueptow LM (2017) Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *J Vis Exp*, 55718.
- [31] Mondragón-Rodríguez S, Gu N, Manseau F, Williams S (2018) Alzheimer's transgenic model is characterized by very early brain network alterations and β -CTF fragment accumulation: Reversal by β -secretase inhibition. *Front Cell Neurosci* **12**, 121.
- [32] Hatch RJ, Wei Y, Xia D, Götz J (2017) Hyperphosphorylated tau causes reduced hippocampal CA1 excitability by relocating the axon initial segment. *Acta Neuropathol* **133**, 717–730.
- [33] Song L, Lu SX, Ouyang X, Melchor J, Lee J, Terracina G, Wang X, Hyde L, Hess JF, Parker EM, Zhang L (2015) Analysis of tau post-translational modifications in rTg4510 mice, a model of tau pathology. *Mol Neurodegener* **10**, 14.
- [34] Spires TL, Orne JD, SantaCruz K, Pitstick R, Carlson GA, Ashe KH, Hyman BT (2006) Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *Am J Pathol* **168**, 1598–1607.
- [35] Pelucchi S, Stringhi R, Marcello E (2020) Dendritic spines in Alzheimer's disease: How the actin cytoskeleton contributes to synaptic failure. *Int J Mol Sci* **21**, 908.
- [36] Drummond E, Pires G, MacMurray C, Askenazi M, Nayak S, Bourdon M, Safar J, Ueberheide B, Wisniewski T (2020) Phosphorylated tau interactome in the human Alzheimer's disease brain. *Brain* **143**, 2803–2817.
- [37] Kopeikina JK, Polydoro M, Tai HC, Yaeger E, Carlson GA, Pitstick R, Hyman BT, Spires-Jones TL (2013) Synaptic alterations in the rTg4510 mouse model of tauopathy. *J Comp Neurol* **521**, 1334–1353.
- [38] Kopeikina JK, Wegmann S, Pitstick R, Carlson GA, Bacskaí BJ, Betensky RA, Hyman BT, Spires-Jones TL (2013) Tau causes synapse loss without disrupting calcium homeostasis in the rTg4510 model of tauopathy. *PLoS One* **8**, e80834.
- [39] Dalby NO, Volbracht C, Helboe L, Larsen PH, Jensen HS, Egebjerg J, Elvang AB (2014) Altered function of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the rTg4510 mouse model of tauopathy. *J Alzheimers Dis* **40**, 429–442.
- [40] Helboe L, Egebjerg J, Barkholt P, Volbracht C (2017) Early depletion of CA1 neurons and late neurodegeneration in a mouse tauopathy model. *Brain Res* **1665**, 22–35.
- [41] Goedert M and Jakes R (2005) Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta* **1739**, 240–250.
- [42] Goedert M (2018) Tau filaments in neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* **14**, 2383–2391.
- [43] Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölling H, Chieng BC, Christie MDJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Götz J (2010) Dendritic function of tau mediates amyloid beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* **142**, 387–397.
- [44] Blackmore T, Meftah S, Murray TK, Craig PJ, Blockeel A, Phillips K, Eastwood B, O'Neill MJ, Marston H, Ahmed Z, Gilmour G, Gastambide F (2017) Tracking progressive pathological and functional decline in the rTg4510 mouse model of tauopathy. *Alzheimers Res Ther* **9**, 77.
- [45] Arendash GW, Lewis J, Leighty RE, McGowan E, Cracchiolo JR, Hutton M, Garcia MF (2004) Multi-metric behavioral comparison of APPsw and P301L models for Alzheimer's disease: Linkage of poorer cognitive performance to tau pathology in forebrain. *Brain Res* **1012**, 29–41.
- [46] Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* **309**, 476–481.

- [47] Mitchison T, Kirschner M (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* **1**, 761-772.
- [48] Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* **84**, 361-384.
- [49] Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1994) Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* **33**, 9511-9522.
- [50] Ebner A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: Implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* **143**, 777-794.
- [51] Baudier J, Lee SH, Cole RD (1987) Separation of the different microtubule-associated tau protein species from bovine brain and their mode II phosphorylation by Ca²⁺/phospholipid-dependent protein kinase C. *J Biol Chem* **262**, 17584-17590.
- [52] Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: Generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* **147**, 58-62.
- [53] Cho JH, Johnson GVW (2002) Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3 beta) phosphorylates tau at both primed and unprimed sites: Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem* **278**, 187-193.
- [54] Shipton OA, Leitz JR, Dworzak J, Acton CEJ, Tunbridge EM, Denk F, Dawson HN, Vitek MP, Wade-Martins R, Paulsen O, Vargas-Caballero M (2011) Tau protein is required for amyloid beta-induced impairment of hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* **31**, 1688-1692.
- [55] Regan P, Piers T, Yi JH, Kim DH, Huh S, Park SJ, Ryu JH, Whitcomb DJ, Cho K (2015) Tau phosphorylation at serine 396 residue is required for hippocampal LTD. *J Neurosci* **35**, 4804-4812.
- [56] Dotti CG, Banker GA, Binder LI (1987) The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat *in situ* and in cell culture. *Neuroscience* **23**, 121-130.
- [57] Kopke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1993) Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* **268**, 24374-24384.
- [58] Mondragón-Rodríguez S, Basurto-Islas G, Santa-Maria I, Mena R, Binder LI, Avila J, Smith MA, Perry G, García-Sierra F (2008) Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol* **89**, 81-90.
- [59] Ramsden M, Kotilinek L, Forster C, Paulson J, McGowan E, SantaCruz K, Guimaraes A, Yue M, Lewis J, Carlson G, Hutton M, Ashe KH (2005) Age dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J Neurosci* **25**, 10637-10647.
- [60] Ballatore C, Lee VMY, Trojanowski JQ (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**, 663-672.
- [61] Chidambaram SB, Rathipriya AG, Bolla SR, Bhat A, Ray B, Mahalakshmi AM, Manivasagam T, Thenmozhi AJ, Essa MM, Guillemain GJ, Chandra R, Saktharkar MK (2019) Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **92**, 161-193.
- [62] Liu Y, Lv K, Li Z, Yu ACH, Chen J, Teng J (2012) PAC-SIN1, a Tau-interacting protein, regulates axonal elongation and branching by facilitating microtubule instability. *J Biol Chem* **287**, 39911-39924.
- [63] Mondragón-Rodríguez S, Gu N, Fasano C, Peña-Ortega F, Williams S (2019) Functional connectivity between hippocampus and lateral septum is affected in very young Alzheimer's transgenic mouse model. *Neuroscience* **401**, 96-105.
- [64] Dávila-Bouziguet E, Targa-Fabra G, Ávila J, Soriano E, Pascual M (2019) Differential accumulation of Tau phosphorylated at residues Thr231, Ser262 and Thr205 in hippocampal interneurons and its modulation by Tau mutations (VLW) and amyloid-β peptide. *Neurobiol Dis* **125**, 232-244.
- [65] Cowan RL, Wilson CJ (1994) Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex. *J Neurophysiol* **71**, 17-32.
- [66] Pagliardini S, Funk GD, Dickson CT (2013) Breathing and brain state: Urethane anesthesia as a model for natural sleep. *Respir Physiol Neurobiol* **188**, 324-332.
- [67] Crimins JL, Rocher AB, Luebke JI (2012) Electrophysiological changes precede morphological changes to frontal cortical pyramidal neurons in the rTg4510 mouse model of progressive tauopathy. *Acta Neuropathol* **124**, 777-795.
- [68] Booth CA, Witton J, Nowacki J, Tsaneva-Atanasova K, Jones MW, Randall AD, Brown JT (2016) Altered intrinsic pyramidal neuron properties and pathway-specific synaptic dysfunction underlie aberrant hippocampal network function in a mouse model of tauopathy. *J Neurosci* **36**, 350-363.
- [69] Amilhon B, Huh CYL, Manseau F, Ducharme G, Nichol H, Adamantidis A, Williams S (2015) Parvalbumin interneurons of hippocampus tune population activity at theta frequency. *Neuron* **86**, 1277-1289.

b. Anexo II



c. Anexo III



La Universidad Nacional Autónoma de México
a través del Instituto de Neurobiología

Otorga el Presente Reconocimiento a:

Carlos Antonio García Carlos

Por haber obtenido el **Segundo Lugar** en **Maestría** con el trabajo titulado:

"HYPERPHOSPHORYLATED TAU REMODELS HIPPOCAMPAL FUNCTION AND MORPHOLOGY IN THE YOUNG RTG4510 MOUSE MODEL OF TAUOPATHY"

en su participación en la Exposición de Carteles de las
29 Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología

Campus UNAM Juriquilla, Qro. 23 de Septiembre de 2022
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"



DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
SECRETARIO ACADÉMICO



d. Anexo IV



11. LITERATURA CITADA

- Ahnaou, A., Moechars, D., Raeymaekers, L., Biermans, R., Manyakov, N. V., Bottelbergs, A., ... & Drinkenburg, W. H. (2017). Emergence of early alterations in network oscillations and functional connectivity in a tau seeding mouse model of Alzheimer's disease pathology. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Ahnaou, A. et al. (2020) "Functional alterations in the olfactory neuronal circuit occur before hippocampal plasticity deficits in the p301s mouse model of tauopathy: Implications for early diagnosis and translational research in Alzheimer's disease," *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), pp. 1–17. Doi:10.3390/ijms21155431.
- Al., S. et (2016) "Alzheimer's disease," *Lancet* (London, England), 388(10043), pp. 505–517. Doi:10.1016/S0140-6736(15)01124-1.
- Albert, M.S. et al. (2011) "The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease," *Alzheimer's and Dementia*, 7(3), pp. 270–279. Doi:10.1016/j.jalz.2011.03.008.
- Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M. J., Jakes, R., Virdee, K., Yoshida, H., Holzer, M., Craxton, M., Emson, P.C., Atzori, C., Migheli, A., Crowther, R.A., Ghetti, B., Spillantini, M.G., & Goedert, M. (2002). Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *Journal of Neuroscience*, 22(21), 9340-9351.
- Amilhon, B. et al. (2015) "Parvalbumin Interneurons of Hippocampus Tune Population Activity at Theta Frequency," *Neuron*, 86(5), pp. 1277–1289. Doi:10.1016/J.NEURON.2015.05.027.

- Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, de Silva R, Tucker KL, Barde YA, Duff K, Davies P. Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem*. 2003 Aug;86(3):582-90.
- Augustinack, J.C. et al. (2002) "Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease," *Acta Neuropathologica*, 103(1), pp. 26–35. Doi:10.1007/s004010100423.
- Ayodele, T. et al. (2021) "Early-Onset Alzheimer's Disease: What Is Missing in Research?," *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 21(2). Doi:10.1007/S11910-020-01090-Y.
- Basurto-Islas, G. et al. (2008a) "Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid 391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 67(5), pp. 470–483. Doi:10.1097/NEN.0b013e31817275c7.
- Basurto-Islas, G. et al. (2008b) "Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid 391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* [Preprint]. Doi:10.1097/NEN.0b013e31817275c7.
- Belluscio, M. A., Mizuseki, K., Schmidt, R., Kempter, R., & Buzsáki, G. (2012). Cross-frequency phase–phase coupling between theta and gamma oscillations in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 32(2), 423-435.
- Blennow K, Bogdanovic N, Alafuzoff I, Ekman R, Davidsson P. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: relation to severity of dementia, but not to senile plaques, neurofibrillary tangles, or the ApoE4 allele. *J Neural Transm (Vienna)*. 1996;103(5):603-18. doi: 10.1007/BF01273157. PMID: 8811505.
- Blennow, K. and Zetterberg, H. (2018) "Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future," *Journal of internal medicine*, 284(6), pp. 643–663. Doi:10.1111/JOIM.12816.

- Boekhoorn, K. et al. (2006) "Improved long-term potentiation and memory in young tau-P301L transgenic mice before onset of hyperphosphorylation and tauopathy," *Journal of Neuroscience*, 26(13), pp. 3514–3523. Doi:10.1523/JNEUROSCI.5425-05.2006.
- Booth, C.A. et al. (2016) "Altered intrinsic pyramidal neuron properties and pathway-specific synaptic dysfunction underlie aberrant hippocampal network function in a mouse model of tauopathy," *Journal of Neuroscience*, 36(2), pp. 350–363. Doi:10.1523/JNEUROSCI.2151-15.2016.
- Braak, H. and Braak, E. (1991) "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes," *Acta Neuropathologica* [Preprint]. Doi:10.1007/BF00308809.
- Brookmeyer, R. et al. (2007) "Forecasting the global burden of Alzheimer's disease," *Alzheimer's and Dementia* [Preprint]. Doi:10.1016/j.jalz.2007.04.381.
- Brookmeyer, R. et al. (2018) "Forecasting the prevalence of preclinical and clinical Alzheimer's disease in the United States," *Alzheimer's and Dementia* [Preprint]. Doi:10.1016/j.jalz.2017.10.009.
- de Calignon, A. et al. (2009) "Tangle-bearing neurons survive despite disruption of membrane integrity in a mouse model of tauopathy," *Journal of Neuro pathology and Experimental Neurology*, 68(7), pp. 757–761. Doi:10.1097/NEN.0b013e3181a9fc66.
- Buzsáki, G., Buhl, D. L., Harris, K. D., Csicsvari, J., Czeh, B., & Morozov, A. (2003). Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience*, 116(1), 201-211.
- Chen, Y., Fu, A.K.Y. and Ip, N.Y. (2019) "Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: Mechanisms and therapeutic strategies," *Pharmacology and Therapeutics* [Preprint]. Doi:10.1016/j.pharmthera.2018.11.006.

- Chidambaram, S.B. et al. (2019) "Dendritic spines: Revisiting the physiological role," *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. Elsevier Inc., pp. 161–193. Doi:10.1016/j.pnpbp.2019.01.005.
- Cho, H., Choi, J. Y., Hwang, M. S., Lee, J. H., Kim, Y. J., Lee, H. M., ... & Lee, M. S. (2016). tau PET in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology*, 87(4), 375-383.
- Colgin, L.L. (2016) "Rhythms of the hippocampal network," *Nature Reviews Neuroscience*, pp. 239–249. Doi:10.1038/nrn.2016.21.
- Corbett, N.J. and Hooper, N.M. (2018) "Soluble amyloid precursor protein α : Friend or foe?," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp. 177–183. Doi:10.1007/978-981-13-3065-0_13.
- Crimins, J.L., Rocher, A.B. and Luebke, J.I. (2012) "Electrophysiological changes precede morphological changes to frontal cortical pyramidal neurons in the rTg4510 mouse model of progressive tauopathy," *Acta Neuropathologica*, 124(6), pp. 777–795. Doi:10.1007/s00401-012-1038-9.
- Erkkinen, M.G., Kim, M.O. and Geschwind, M.D. (2018) "Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(4). Doi:10.1101/cshperspect.a033118.
- Esquerda-Canals, G. et al. (2017) "Mouse Models of Alzheimer's Disease," *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), pp. 1171–1183. Doi:10.3233/JAD-170045.
- Frandemiche, M.L., De Seranno, S., Rush, T., Borel, E., Elie, A., Arnal, I., Lante´ , F., and Buisson, A. (2014). Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *J. Neurosci.* 34, 6084–6097.
- Gaubert, S. et al. (2019) "EEG evidence of compensatory mechanisms in preclinical Alzheimer's disease," *Brain: a journal of neurology*, 142(7), pp. 2096–2112. Doi:10.1093/BRAIN/AWZ150.

- Gaugler, J. et al. (2016) "2016 Alzheimer's disease facts and figures," Alzheimer's and Dementia [Preprint]. Doi:10.1016/j.jalz.2016.03.001.
- Goedert, M., & Jakes, R. (2005). Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1739(2-3), 240-250.
- Goodman, M.S. et al. (2018) "Theta-Gamma coupling and working memory in Alzheimer's dementia and mild cognitive impairment," *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(APR), p. 101. Doi:10.3389/fnagi.2018.00101.
- Goutagny, R. et al. (2013) "Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before A β overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease," *European Journal of Neuroscience*, 37(12), pp. 1896–1902. Doi:10.1111/ejn.12233.
- Goutagny, R., Jackson, J. and Williams, S. (2009) "Self-generated theta oscillations in the hippocampus," *Nature Neuroscience*, 12(12), pp. 1491–1493. Doi:10.1038/nn.2440.
- Hempel H, Bürger K, Pruessner JC, Zinkowski R, DeBernardis J, Kerkman D, Leinsinger G, Evans AC, Davies P, Möller HJ, Teipel SJ. Correlation of cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231 with rates of hippocampal atrophy in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2005 May;62(5):770-3. doi: 10.1001/archneur.62.5.770. PMID: 15883264.
- Hampton DW, Webber DJ, Bilican B, Goedert M, Spillantini MG, Chandran S. Cell-mediated neuroprotection in a mouse model of human tauopathy. *J Neurosci*. 2010 Jul 28;30(30):9973-83.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *science*, 297(5580), 353-356.

- Hatch, R.J. et al. (2017) "Hyperphosphorylated tau causes reduced hippocampal CA1 excitability by relocating the axon initial segment," *Acta Neuropathologica*, 133(5), pp. 717–730. Doi:10.1007/s00401-017-1674-1.
- Hervy, J. and Bicout, D.J. (2019) "Dynamical decoration of stabilized-microtubules by tau-proteins," *Scientific Reports*, 9(1). Doi:10.1038/s41598-019-48790-1.
- Iqbal, K., Liu, F. and Gong, C.X. (2016) "tau and neurodegenerative disease: The story so far," *Nature Reviews Neurology* [Preprint]. Doi:10.1038/nrneurol.2015.225.
- Ittner, L. M., & Götz, J. (2011). Amyloid- β and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(2), 67-72.
- Ittner, A. and Ittner, L.M. (2018) "Dendritic tau in Alzheimer's Disease," *Neuron*. Cell Press, pp. 13–27. Doi:10.1016/j.neuron.2018.06.003.
- Ittner, L.M. et al. (2010a) "Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in 76 Alzheimer's disease mouse models," *Cell*, 142(3), pp. 387–397. Doi:10.1016/j.cell.2010.06.036.
- Kandimalla, R. et al. (2018) "Hippocampal phosphorylated tau induced cognitive decline, dendritic spine loss and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease," *Human Molecular Genetics* [Preprint]. Doi:10.1093/hmg/ddx381.
- Klausberger, T. et al. (2003) "Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo," *Nature*, 421(6925), pp. 844–848. Doi:10.1038/nature01374.
- Koenig, T., Smailovic, U. and Jelic, V. (2020) "Past, present and future EEG in the clinical workup of dementias," *Psychiatry research. Neuroimaging*, 306. Doi:10.1016/J.PSCYCHRESNS.2020.111182.
- Kolarova, M. et al. (2012) "Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease," *International Journal of Alzheimer's Disease* [Preprint]. Doi:10.1155/2012/731526.

- La Joie R, Visani AV, Baker SL, Brown JA, Bourakova V, Cha J, Chaudhary K, Edwards L, Iaccarino L, Janabi M, Lesman-Segev OH, Miller ZA, Perry DC, O'Neil JP, Pham J, Rojas JC, Rosen HJ, Seeley WW, Tsai RM, Miller BL, Jagust WJ, Rabinovici GD. Prospective longitudinal atrophy in Alzheimer's disease correlates with the intensity and topography of baseline tau-PET. *Sci Transl Med.* 2020 Jan 1;12(524):eaau5732. doi: 10.1126/scitranslmed.aau5732. PMID: 31894103; PMCID: PMC7035952.
- Lisman, J. et al. (2017) "Viewpoints: How the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition," *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 1434–1447. Doi:10.1038/nn.4661.
- Luna-Muñoz, J. et al. (2007) "Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific 77 Alzheimer-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease," *Journal of Alzheimer's Disease*, 12(4), pp. 365–375. Doi:10.3233/JAD-2007-12410.
- Mandelkow, E. et al. (2007) "Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease," in *Brain Pathology*. Doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00053.x.
- Mandelkow, E.M. et al. (1995) "tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules," *Neurobiology of Aging* [Preprint]. Doi:10.1016/0197-4580(95)00025-A.
- Medina, M. and Avila, J. (2014) "Further understanding of tau phosphorylation: Implications for therapy," *Expert Review of Neurotherapeutics* [Preprint]. Doi:10.1586/14737175.2015.1000864.
- Menkes-Caspi, N., Yamin, H. G., Kellner, V., Spires-Jones, T. L., Cohen, D., & Stern, E. A. (2015). Pathological tau disrupts ongoing network activity. *Neuron*, 85(5), 959-966.

- Mietelska-Porowska, A. et al. (2014) "tau protein modifications and interactions: Their role in function and dysfunction," *International Journal of Molecular Sciences* [Preprint]. Doi:10.3390/ijms15034671.
- Mondragón-Rodríguez et al. (2012) "Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation," *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), pp. 32040–32053. Doi:10.1074/jbc.M112.401240.
- Mondragón-Rodríguez, S. et al. (2008) "Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease," *International Journal of Experimental Pathology*, 89(2), pp. 81–90. Doi:10.1111/j.1365-2613.2007.00568.x.
- Mondragón-Rodríguez, S. et al. (2010) "Causes versus effects: The increasing complexities of Alzheimer's disease pathogenesis," *Expert Review of Neurotherapeutics*, pp. 683–691. Doi:10.1586/ern.10.27.
- Mondragón-Rodríguez, S. et al. (2012a) "Amyloid beta and tau proteins as therapeutic targets for Alzheimer's disease treatment: Rethinking the current strategy," *International Journal of Alzheimer's Disease*, pp. 1–7. Doi:10.1155/2012/630182.
- Mondragón-Rodríguez, S. et al. (2012b) "Glycogen synthase kinase 3: A point of integration in Alzheimer's disease and a therapeutic target?," *International Journal of Alzheimer's Disease*. Doi:10.1155/2012/276803.
- Mondragón-Rodríguez, S. et al. (2013) "Phosphorylation of tau protein as the link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and connectivity failure: Implications for Alzheimer's disease," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Doi:10.1155/2013/940603.
- Mondragón-Rodríguez, S. et al. (2014) "Phosphorylation of tau protein at sites Ser396-404 is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome," *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(2), pp. 121–135. Doi:10.1111/nan.12084.

- Mondragón-Rodríguez, S. et al. (2017) "tau, Amyloid Beta and Deep Brain Stimulation: Aiming to Restore Cognitive Deficit in Alzheimer's Disease," *Current Alzheimer Research*, 14, pp. 40–46. Doi:10.2174/1567205013666160819.
- Mondragón-Rodríguez, S. et al. (2018) "Alzheimer's transgenic model is characterized by very early brain network alterations and β -CTF fragment accumulation: Reversal by β -secretase inhibition," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(May), pp. 1–17. Doi:10.3389/fncel.2018.00121.
- Mondragón-Rodríguez, S. et al. (2019) "Functional Connectivity between Hippocampus and Lateral Septum is Affected in Very Young Alzheimer's Transgenic Mouse Model," *Neuroscience*, 401, pp. 96–105. Doi:10.1016/j.neuroscience.2018.12.042.
- Mondragón-Rodríguez, S., Perry, G. and Peña-Ortega, F. (2017) "tau Proteins," *Drug Discovery Approaches for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Alzheimer's Disease*, pp. 145–160. Doi:10.1016/B978-0-12-802810-0.00008-8.
- Mondragón-Rodríguez, S., Salgado-Burgos, H. and Peña-Ortega, F. (2020a) "Circuitry and Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease: A New tau Hypothesis," *Neural Plasticity*, 2020, pp. 1–11. Doi:10.1155/2020/2960343.
- Mondragón-Rodríguez, S., Salgado-Burgos, H. and Peña-Ortega, F. (2020b) "Circuitry and Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease: A New tau Hypothesis," *Neural Plasticity*, 2020. Doi:10.1155/2020/2960343.
- Morris, G.P., Clark, I.A. and Vissel, B. (2018) "Questions concerning the role of amyloid- β in the definition, aetiology and diagnosis of Alzheimer's disease," *Acta Neuropathologica* [Preprint]. Doi:10.1007/s00401-018-1918-8.
- Morris, R. (1996) The association fiber system linking the mid-dorsolateral frontal cortex with the retrosplenial cortex and the posterior hippocampal region in the rhesus monkey / The role of the rubrospinal tract in locomotive arpeggio View project. Doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19990503)407:2<183::AID-CNE3>3.0.CO;2-N.

- Neil, B. (2009) Computational Models of the Spatial and Mnemonic Functions of the Hippocampus, The Hippocampus Book. Doi:10.1093/acprof:oso/9780195100273.003.0014.
- O'Brien, R.J. and Wong, P.C. (2011) "Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease," *Annual Review of Neuroscience*, 34, pp. 185–204. Doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113613.
- Palop, J.J. and Mucke, L. (2016) "Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease," *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 777–792. Doi:10.1038/nrn.2016.141.
- Physicians, P.C. (2020) "2020 Alzheimer's disease facts and figures," *Alzheimer's and Dementia*, 16(3), pp. 391–460. Doi:10.1002/alz.12068.
- Physicians, P.C. (2022) "2022 Alzheimer's disease facts and figures," *Alzheimer's and Dementia*, 2022;18:700–789. Doi: 10.1002/alz.12638.
- Rajmohan, R. and Reddy, P.H. (2017) "Amyloid-Beta and Phosphorylated tau Accumulations Cause Abnormalities at Synapses of Alzheimer's disease Neurons," *Journal of Alzheimer's Disease* [Preprint]. Doi:10.3233/JAD-160612.
- Ramsden, M. et al. (2005) "Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L)," *Journal of Neuroscience*, 25(46), pp. 10637–10647. Doi:10.1523/JNEUROSCI.3279-05.2005.
- Reisberg, B. et al. (2003) "Memantine in Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease," *New England Journal of Medicine*, 348(14), pp. 1333–1341. Doi:10.1056/nejmoa013128.
- Santacruz, K. et al. (2005) "Medicine: tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function," *Science*, 309(5733), pp. 476–481. Doi:10.1126/science.1113694.

- Scott, L. et al. (2016) "Neuronal network activity in the hippocampus of tau transgenic (Tg4510) mice," *Neurobiology of Aging*, 37, pp. 66–73. Doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.002.
- Selkoe, D.J. (2002) "Alzheimer's disease is a synaptic failure," *Science* [Preprint]. Doi:10.1126/science.1074069.
- Selkoe, D.J. and Hardy, J. (2016) "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years," *EMBO Molecular Medicine* [Preprint]. Doi:10.15252/emmm.201606210.
- Serrano-Pozo, A. et al. (2011) "Neuropathological alterations in Alzheimer disease," *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [Preprint]. Doi:10.1101/cshperspect.a006189.
- Seubert, P. et al. (1992) "Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids," *Nature*, 359(6393), pp. 325–327. Doi:10.1038/359325A0.
- Sevigny, J. et al. (2016) "The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease," *Nature*, 537(7618), pp. 50–56. Doi:10.1038/nature19323.
- Siddhartha, M.R. et al. (2018) "Phosphorylation of tau protein correlates with changes in hippocampal theta oscillations and reduces hippocampal excitability in Alzheimer's model," *Journal of Biological Chemistry*, 293(22), pp. 8462–8472. Doi:10.1074/jbc.RA117.001187.
- Skoog I, Vanmechelen E, Andreasson LA, Palmertz B, Davidsson P, Hesse C, Blennow K. A population-based study of tau protein and ubiquitin in cerebrospinal fluid in 85-year-olds: relation to severity of dementia and cerebral atrophy, but not to the apolipoprotein E4 allele. *Neurodegeneration*. 1995 Dec;4(4):433-42. doi: 10.1006/neur.1995.0052. PMID: 8846237.
- Soltani Zangbar, H. et al. (2020) "Theta Oscillations through Hippocampal/Prefrontal Pathway: Importance in Cognitive Performances," *Brain Connectivity*. Mary Ann Liebert Inc., pp. 157–169. Doi:10.1089/brain.2019.0733.

- Song, L., Lu, S. X., Ouyang, X., Melchor, J., Lee, J., Terracina, G., ... & Zhang, L. (2015). Analysis of tau post-translational modifications in rTg4510 mice, a model of tau pathology. *Molecular neurodegeneration*, 10(1), 1-11.
- Spires, T. L., Orne, J. D., SantaCruz, K., Pitstick, R., Carlson, G. A., Ashe, K. H., & Hyman, B. T. (2006). Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *The American journal of pathology*, 168(5), 1598-1607.
- Tan, R. et al. (2019) "Microtubules gate tau condensation to spatially regulate microtubule functions," *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 1078–1085. doi:10.1038/s41556-019-0375-5.
- Tanninen, S. E., Nouriziabari, B., Morrissey, M. D., Bakir, R., Dayton, R. D., Klein, R. L., & Takehara-Nishiuchi, K. (2017). Entorhinal tau pathology disrupts hippocampal-prefrontal oscillatory coupling during associative learning. *Neurobiology of aging*, 58, 151-162.
- Tayeb, H.O. et al. (2012) "Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors," *Pharmacology and Therapeutics*, pp. 8–25. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.12.002.
- Uchida, T. and Ishiguro, K. (1990) "Phosphorylation of tau protein," in *Japanese Journal of Geriatrics*.
- Vann, S.D., Aggleton, J.P. and Maguire, E.A. (2009) "What does the retrosplenial cortex do?," *Nature Reviews Neuroscience*, 10(11), pp. 792–802. doi:10.1038/nrn2733.
- Verret, L. et al. (2012) "Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in alzheimer model," *Cell* [Preprint]. doi:10.1016/j.cell.2012.02.046.
- Voss, J.L. et al. (2017) "A Closer Look at the Hippocampus and Memory," *Trends in Cognitive Sciences*. Elsevier Ltd, pp. 577–588. doi:10.1016/j.tics.2017.05.008.

- Walsh, D.M. and Selkoe, D.J. (2020) "Amyloid β -protein and beyond: the path forward in Alzheimer's disease," *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Ltd, pp. 116–124. doi:10.1016/j.conb.2020.02.003.
- Wang, Y. and Mandelkow, E. (2016a) "tau in physiology and pathology," *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 5–21. doi:10.1038/nrn.2015.1.
- Wang, Y. and Mandelkow, E. (2016b) "tau in physiology and pathology," *Nature Reviews Neuroscience* [Preprint]. doi:10.1038/nrn.2015.1.
- Weller, J. and Budson, A. (2018) "Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment," *F1000Research* [Preprint]. doi:10.12688/f1000research.14506.1.
- Wong, G.T. et al. (2004) "Chronic Treatment with the-Secretase Inhibitor LY-411,575 Inhibits-Amyloid Peptide Production and Alters Lymphopoiesis and Intestinal Cell Differentiation* Downloaded from," *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 279(13), pp. 12876–12882. doi:10.1074/jbc.M311652200.
- Xu H, Rösler TW, Carlsson T, de Andrade A, Bruch J, Höllerhage M, Oertel WH, Höglinger GU. Memory deficits correlate with tau and spine pathology in P301S MAPT transgenic mice. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014 Dec;40(7):833-43.
- Zhan, Y. et al. (2016) "Impaired episodic memory network in subjects at high risk for Alzheimer's disease," in *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS*. doi:10.1109/EMBC.2016.7591608.
- Zhang, Y. and Xu, H. (2007) "Molecular and Cellular Mechanisms for Alzheimers Disease:Understanding APP Metabolism," *Current Molecular Medicine* [Preprint]. doi:10.2174/156652407782564462.
- Zhang, Y.W. et al. (2011) "APP processing in Alzheimer's disease," *Molecular Brain* [Preprint]. doi:10.1186/1756-6606-4-3.

