



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

T E S I S

Que para optar por el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

PERLA GONZÁLEZ PEREYRA

TUTOR:

DR. SIDDHARTHA MONDRAGÓN RODRÍGUEZ

Instituto de Neurobiología, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. ADÁN HERNANDEZ CORTÉS

Instituto de Neurobiología, UNAM

DR. FRANCISCO GABRIEL VÁZQUEZ CUEVAS

Instituto de Neurobiología, UNAM

QUERÉTARO, QRO. JUNIO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología**

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: **Perla González Pereyra**, cuyo título es: “**Alteraciones de los circuitos neuronales en un modelo de ratón transgénico que desarrolla marcadores de la enfermedad de Alzheimer**” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Secretario

Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez

Vocal

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Suplente

Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

Suplente

Dr. José Gerardo Rojas Piloni

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

ALTERACIONES DE LOS CIRCUITOS NEURONALES EN UN MODELO DE RATÓN TRASGÉNICO QUE DESARROLLA MARCADORES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

RESUMEN

La hiperfosforilación de la proteína tau en varios sitios, incluidos los cercanos a su región de dominio de microtúbulos (rDM), se considera un evento clave para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA). Aquí, reportamos alteraciones muy tempranas en la actividad theta del hipocampo de ratones triple transgénicos que desarrollan marcadores de la EA (3xTg-AD). Así mismo, demostramos que las neuronas piramidales en ratones 3xTg-AD acumulan proteína tau hiperfosforilada, y dicha acumulación se correlaciona con los cambios en las oscilaciones theta del hipocampo. En consonancia con los datos anteriores, se encontró una mayor actividad en el glucógeno sintasa cinasa 3β (GSK3 β). Por otro lado, datos conductuales indican que durante etapas tempranas del desarrollo de la EA el incremento en los niveles de fosforilación no afecta las conductas dependientes, del hipocampo, lo que podría implicar que la fosforilación es un mecanismo de compensación homeostática.

SUMMARY

Tau hyperphosphorylation at several sites, including those close to their microtubule domain region (MDr), is considered a key event for Alzheimer's disease (AD) development. Here, we reported very early alterations in the hippocampal theta activity from one-month-old triple transgenic AD mice (3xTg-AD). Thus, we showed that pyramidal neurons in 3xTg-AD mice accumulate hyperphosphorylated tau protein, and such accumulation correlate with changes in hippocampal theta oscillations. Consistent with the above data, increased activity in glycogen synthase kinase 3 β was found. Altogether, our data showed that while the increase in phosphorylated tau at very early stages has no effect on hippocampal-dependent tasks, it could protect the hippocampal circuit from overexcitation.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. CVU/Becario: 770484/612271

El presente proyecto fue realizado en el Instituto de Neurobiología en el Laboratorio C-01 de Circuitos Neuronales a cargo del Dr. Fernando Peña Ortega y fue financiado por CONACYT a través del proyecto 269021 (Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez) y la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN202018 (Dr. Fernando Peña Ortega).

Al Dr. Mark P. Brandon profesor adjunto del departamento de Psiquiatría de la Universidad McGill e investigador en el Douglas Hospital Research Center por la oportunidad de realizar una estancia de investigación en su laboratorio, con el apoyo del programa de Becas Mixtas de Movilidad al Extranjero implementado por CONACYT.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad y el apoyo ofrecido durante mi estancia en este instituto; en particular al Dr. José Fernando Peña Ortega, Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez y al Dr. Benito Ordaz Sánchez por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, así como por la constante asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Alejandra Castilla León y al MVZ José Martín García Servín responsables del Bioterio por proveer los animales para los experimentos y la asesoría brindada en su manejo. A la Dra. Deysi Gasca Martínez responsable de la Unidad de Análisis Conductual por el espacio brindado para la realización de las pruebas de conducta.

A la Dra. Sofía Y. Díaz Miranda, a la M. en C. Azucena Aguilar Vázquez y a la Dra. Erika M. Orta Salazar por la guía prestada durante las pruebas conductuales y la realización de las técnicas de inumohistoquímica.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico de la Unidad de Enseñanza por la información y asesoramiento en los procesos burocráticos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, José Alfredo González Villalobos y Ma. Eugenia Pereyra Pérez por el amor, la comprensión y el apoyo incondicional.

A mis hermanas Violeta González Pereyra y Daniela González Pereyra por la complicidad eterna.

A mis pequeños, Braulio González Pereyra y Natalia Castillo González por enseñarme a soñar.

A Luis Eduardo Cardona González por su paciencia, por no dejar que me rindiera, por acompañarme en este pedacito de vida.

A mis compañeros y amigos; a Georgina Anahí Salas Gallardo y Ana María Malagón Leal por compartir esta aventura conmigo; a Arturo González Isla y Martín Macías Ramírez por las enseñanzas y el buen humor.

Índice

Abreviaturas	9
1. Introducción	10
2. Antecedentes	12
2.1 Características clínicas y neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer	12
2.2 Diagnóstico y opciones terapéuticas	13
2.4 Fosforilación de la proteína tau	17
2.5 El hipocampo durante la EA	20
2.6 La corteza entorrinal y la región septal	22
2.7 Actividad cerebral theta	24
2.8 Mutaciones genéticas asociadas al desarrollo de la EA	25
2.9 Modelos transgénicos	27
3. Planteamiento del problema	29
4. Hipótesis	29
5. Objetivo general	29
6. Objetivos específicos	29
7. Metodología científica	30
7.1 Disección	30
7.2 Registros electrofisiológicos	30
7.3 Análisis de registros electrofisiológicos	30
7.4 Prueba de conducta	31
7.5 Histología	31
7.6 Western Blot	32
7.7 Estadística	33
8. Resultados	33
8.1 Preparación septo-hipocampal para el registro de actividad neuronal theta.	33
8.2 Alteración de potencia en la actividad theta hipocampal en el modelo 3xTg-AD	36
8.3 Ausencia de alteraciones cognitivas en el modelo 3xTg-AD	38
8.4 Hiperfosforilación de la proteína tau en el modelo 3xTg-AD	40
8.5 Exploración de cinasas responsables de la hiperfosforilación de la proteína tau en el modelo 3xTg-AD	45

9. Discusión	46
10. Conclusiones	50
11. Bibliografía	51
12. Anexos	61

Abreviaturas

βA	Beta amiloide
3xTg-AD	Triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer
APP	Proteína precursora de amiloide
ATP	Adenosín trifosfato
CA	Cuerno de Amón
Cdk5	Cinasa dependiente de ciclina 5
EA	Enfermedad de Alzheimer
Erk	Cinasas reguladas or señales extracelulares
GSK3	Glucógeno sintasa cinasa 3
GTP	Guanosín trifosfato
JNK	Cinasa c-Jun N terminal
MNFs	Marañas neurofibrilares
MSDBB	Septum medial y Banda Diagonal de Broca
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NMDA	N- metil-D-aspartato
Non-Tg	No transgénico
PET	Tomografía por emisión de positrones
PKC	Portein quinasa C
PPDK	Cinasas dirigidas a prolina
PSEN	Presinilina
RACK 1	Receptor a cinasa activada 1
REM	Movimientos oculares rápidos
RMI	Resonancia magnética
S	Serina
T	Treonina
TPK	Tirosín cinasas

1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por déficits cognitivos relacionados con actividad hipocampal anómala (Lei et al. 2014; Gouw et al. 2017). El hipocampo, una estructura con un rol clave en la memoria y el aprendizaje, se ve afectado de forma dramática por las lesiones que caracterizan a esta enfermedad: placas formadas por la proteína beta amiloide (β A) y marañas neurofibrilares compuestas por proteína tau en estado de hiperfosforilación (Mondragón-Rodríguez et al. 2014)

Ambas marcas histopatológicas han sido señaladas como causantes de procesos neurotóxicos y neurodegenerativos que explican el cuadro clínico de la enfermedad (Mondragón-Rodríguez et al 2016). Sin embargo, existen nuevas hipótesis que establecen que las alteraciones en la actividad cerebral preceden a estas lesiones. (Mucke and et al. et al. 2000; Lei et al. 2016)

Aunque los mecanismos responsables de estas alteraciones tempranas aun no son claros, los fragmentos solubles de β A y la proteína tau hiperfosforilada se han postulado como los desencadenantes de estas anomalías (Ittner et al. 2010; Lei 2016 et al. 2016).

La comprensión de las etapas preclínicas de la EA resulta fundamental para el diseño de enfoques exitosos en retrasar, incluso revertir, el deterioro cognitivo y la demencia que caracterizan a esta enfermedad.

Con base en lo anterior, utilizando una preparación experimental que nos permitiera conservar los circuitos necesarios para la generación del ritmo cerebral registrado en la banda theta, se llevaron a cabo registros electrofisiológicos en la región de CA1 del hipocampo de ratones 3xTg-AD de 30 días de edad. La actividad theta exhibió un aumento significativo a nivel de potencia en el animal transgénico con respecto al no transgénico (Non-Tg). Adicionalmente fueron detectados eventos paroxísticos en la actividad theta de este modelo. A pesar del hallazgo de estas alteraciones, los ratones 3xTg-AD no mostraron alteraciones cognitivas al ser evaluados en una tarea conductual dependiente de hipocampo.

Al valorar la integridad estructural de las neuronas responsables de la generación de la actividad theta, se demostró que existen cambios en los patrones de fosforilación de la proteína tau en los animales 3xTg-AD, más específicamente

un aumento significativo de la fosforilación de la proteína en los sitios serina 396 (S396) y treonina 231 (T231) respecto a los animales Non-Tg.

Finalmente, los datos de este proyecto evidenciaron un aumento de actividad del glucógeno sintasa cinasa 3 beta ($GSK3\beta$) en el modelo transgénico cuando se comparó con el Non-Tg.

Estos resultados nos permiten proponer a estos fines cambios en la actividad eléctrica cerebral, por su presentación prodrómica, como un posible biomarcador en el diagnóstico en los procesos neurodegenerativos como la EA. Aunado a esto, este trabajo postula a la hiperfosforilación de la proteína tau como un evento de carácter inicial en el proceso neurodegenerativo.

2. Antecedentes

2.1 Características clínicas y neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento neurodegenerativo y crónico que representa la primera causa a nivel mundial de demencia en la población de la tercera edad (Alzheimer's 2014). Para el año 2010 cerca de 35 millones de personas padecían este trastorno y se espera que para el año 2030 la cifra alcance los 66 millones (Prince M et al. 2013).

Ensombreciendo el panorama para el 2020, un estimado de 60% de las personas afectadas por EA vivirá en países en vías de desarrollo (Ferri et al. 2005). En México en el 2007 la tasa de incidencia para la enfermedad de Alzheimer fue de 25.55 personas por cada 1000 personas-año (Prince et al. 2012). El costo que se prevé para 2030 es de 1,117 billones de dólares a nivel mundial y el impacto económico en los sistemas de salud representará un importante desafío para la salud pública (Alzheimer's 2014). Por tal razón se continúan realizando numerosos esfuerzos en la generación de nuevas y mejores estrategias para el diagnóstico oportuno de la patología lo que se traducirá en alternativas de tipo terapéutico superiores a las actuales. Lamentablemente, pese a la voluntad de generar nuevas herramientas para el diagnóstico temprano de la EA, el establecimiento del mismo ocurre hasta que se presenta la etapa clínica de la patología (Mendez et al. 2006; Dubois et al. 2007).

En su etapa inicial, la EA, pasa desapercibida si no se realiza una pesquisa dirigida ya que suele confundirse con actitudes propias de la vejez o síntomas de estrés (Waldemar et al. 2007). Los signos más precoces corresponden a la pérdida de memoria, que regularmente se presenta como una dificultad para recordar hechos de reciente aprendizaje y la inhabilidad de adquirir nuevos conocimientos (Kazui et al. 2005), dificultades en las funciones ejecutivas y trastornos en la memoria semántica y la memoria implícita (Becker et al. 2002). Más tarde los síntomas se vuelven insidiosos y la pérdida de la memoria persiste hasta afectar la memoria a corto plazo (Nelson et al. 2015). Adicionalmente, un porcentaje de pacientes también presentan trastornos en el lenguaje, que se manifiestan como

reducción en el vocabulario, afasia y apraxia (Benke et al. 1993). La apatía suele ser un síntoma que se establece en etapas tempranas y que se mantiene hasta fases tardías. Conforme avanza la enfermedad el deterioro cognitivo es tal que el paciente pierde independencia para realizar tareas sencillas y en los estados graves se vuelven evidentes los cambios de conducta como irritabilidad y labilidad emocional, así como la afectación de la memoria a largo plazo (Honig et al. 2001; Scarmeas et al. 2007).

2.2 Diagnóstico y opciones terapéuticas

Actualmente las opciones terapéuticas para los pacientes diagnosticados con EA se limitan a los inhibidores de la colinesterasa; cuya acción incrementa la cantidad de acetilcolina en la hendidura sináptica y mejora los procesos cognitivos; aunque existen numerosos tratamientos probados en los modelos transgénicos (3xTg-AD) (Romberg et al. 2011) éstos han resultado mucho menos eficientes en los pacientes debido a que no se ha registrado una mejoría en la memoria; esto implica la participación de otros sistemas de neurotransmisores tales como: histamina, GABA, serotonina, adrenalina, etc. (Cuadra et al. 1995; Pepeu et al. 2010). A pesar de los esfuerzos realizados en combinar múltiples blancos terapéuticos que aborden la enfermedad, la recuperación permanece pobre. Las opciones recientemente exploradas utilizan a la proteína beta amiloide (β A) como blanco terapéutico y van desde la generación de anticuerpos monoclonales (Yamada et al. 2009) hasta las inmunizaciones (Lambracht et al. 2009) que buscan inhibir su agregación, sin embargo, la aplicación de anticuerpos monoclonales se limitan a modelos animales y en el caso de las inmunizaciones, su aplicación se asocia a acumulación de proteína tau.

Al contribuir en la patogenia de la EA, la proteína tau constituye otro blanco importante; se ha demostrado en animales transgénicos, que la inmunización con anticuerpos monoclonales contra tau genera una disminución de agregados y retrasa la progresión de la enfermedad (d'Abramo et al. 2015; Yanamandra et al. 2015). De manera reciente han sido probadas drogas cuya acción estimula la degradación autofágica de tau anormalmente fosforilada (Kim, Choi et al. 2016), promueven la regulación de cinasas que median la fosforilación de tau (Sun et al.

2016), hasta la síntesis de tau resistente a la acción de caspasas que previene su infiltración a las espinas dendríticas (Zhao et al. 2016).

Aunque los avances en los tratamientos pueden parecer prometedores, la realidad es que sin un diagnóstico oportuno de la enfermedad los esfuerzos por revertir los síntomas establecidos parecen infructuosos. Hoy en día, las técnicas de diagnóstico utilizadas involucran pruebas cognitivas basadas en criterios clínicos (Aliño et al., 2008; McKhann et al., 2011) o biomarcadores fisiopatológicos como los niveles de β A y proteína tau medidos en el líquido cefalorraquídeo (proteína tau total, tau fosforilada y β A 42) (Vemuri et al. 2009; Blennow et al. 2010; Sweeney et al. 2015) y algunos otros con menor precisión diagnóstica relacionados con la respuesta inflamatoria crónica como las inmunoglobulinas G y M en el plasma sanguíneo (Blennow et al. 2010).

La resonancia magnética (RMI) y la tomografía por emisión de positrones (PET) también han explorado el campo de la EA y gracias a su naturaleza no invasiva complementan la evaluación clínica del paciente; la RMI permite comparar el volumen de la corteza y el hipocampo de pacientes sanos con aquellos que presentan la EA (Jack et al. 1999) y la PET permite evaluar in vivo la actividad β A (Klunk et al. 2014; Price et al. 2005; Brown et al. 2016).

No obstante, pese a lo global que puede ser el abordaje del paciente con EA el problema radica en que los métodos diagnósticos coinciden con el establecimiento clínico de la enfermedad (Mendez et al. 2006; Dubois et al. 2007). La falta de marcadores en etapas tempranas impide el tratamiento oportuno y el pronóstico empeora para los pacientes.

Es claro que el diagnóstico debe establecerse en etapas tempranas, con la finalidad de minimizar daños y mejorar la calidad de vida del paciente; y que el establecimiento de un solo blanco terapéutico parece utópico debido a la complejidad de la enfermedad.

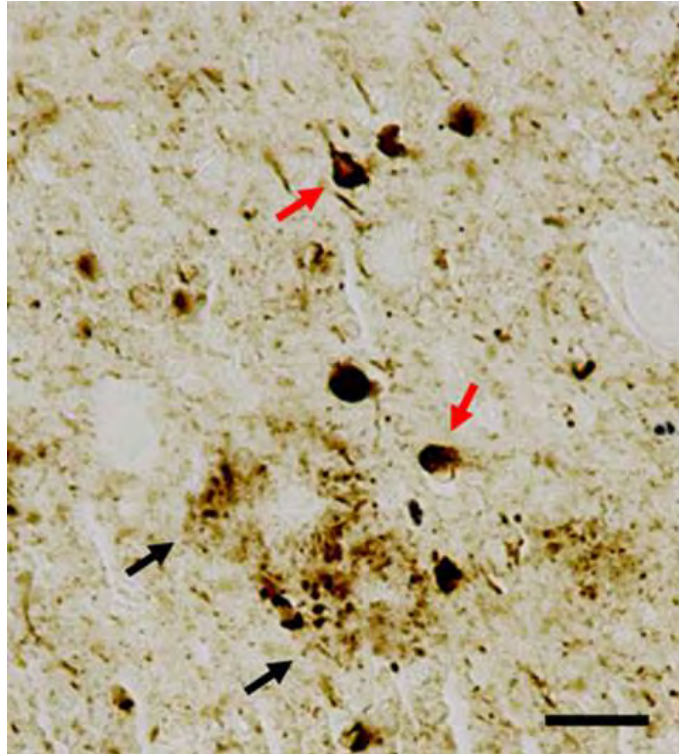


Figura 1. En la Enfermedad de Alzheimer se presentan los agregados de tau intracelular (flechas rojas) y agregados de beta amiloide (flechas negras). La barra indica una escala de 50 μ m (modificado de Mondragón-Rodríguez et al., 2016).

En los estudios de cerebros *post-mortem* de pacientes con EA suelen encontrarse dos tipos de lesiones características de la enfermedad: extracelularmente placas formadas de agregados de proteína beta amiloide (β A) y marañas neurofibrilares constituidas principalmente por la proteína tau (MNFs) (Mondragón-Rodríguez et al. 2016). Las placas de β A están compuestas por un péptido generado a partir de la proteína precursora del beta amiloide (APP) cuya función normal incluye la activación de cinasas (Bogoyevitch et al. 2004), protección contra el estrés oxidativo (Baruch-Suchodolsky et al. 2009) y la regulación del colesterol (Yao et al. 2002; Igbavboa et al. 2009). Existen dos isoformas del β A, el β A-40 y β A-42, ésta última por su naturaleza fibrilar, se encuentra relacionada con diferentes patologías; el mal plegamiento del péptido provoca la generación de placas que por su morfología pueden diferenciarse en difusas y densas, las primeras se encuentran en personas sin alteraciones cognitivas, las segundas son características de la EA y provocan la distrofia y la curvatura de las neuritas (Dorostkar et al. 2015; Mondragón-Rodríguez et al. 2016), la pérdida de sinapsis y

el reclutamiento de astrocitos y microglía (Heneka et al. 2007). La composición del β A puede ser en monómeros, oligómeros o fibras, hasta el momento no se ha definido qué forma es más neurotóxica; por un lado existe evidencia de que el β A, en sus formas fibrilares, afecta la función sináptica y neuronal (Walsh et al. 2004) y que por tanto puede contribuir a la alteración del circuito (Palop et al. 2009) y por otro que dichas alteraciones en la actividad excitatoria de las células piramidales se presentan de manera previa a la fase de agregación (Goutagny et al. 2013). Las lesiones intracelulares (MNFs) están compuestas por proteína tau anormalmente fosforilada, es decir, a diferencia del proceso fisiológico donde la proteína se fosforila y desfosforila dinámicamente en la EA la proteína permanece fosforilada en sitios específicos (Fig. 3). (Mondragón-Rodríguez et al. 2008; Mondragón-Rodríguez et al. 2014). La proteína tau se localiza de manera importante en las células del sistema nervioso, la primera función en la que fue descrita corresponde a la unión y estabilización de los microtúbulos del citoesqueleto neuronal (Weingarten et al. 1975; Witman et al. 1976; Binder et al. 2005); es codificada en el cromosoma 17 y presenta seis isoformas resultantes del empalme alternativo (Goedert et al. 1989), la proteína está subdividida en 4 regiones: a) ácida N-terminal; b) rica en prolina, c) que contiene cuatro dominios repetidos R1, R2, R3 y R4 (también llamados dominios de unión a microtúbulos) (Drewes et al., 1995; Sengupta et al., 1998; Gendron & Petrucelli, 2009) y d) la C terminal. Dentro de los cambios postraduccionales que sufre la proteína tau uno de los más importantes corresponde a su fosforilación (Arendt et al. 2016), ésta suele ocurrir en estados fisiológicos como el desarrollo embrionario y la hibernación (donde el cambio es reversible) y durante trastornos metabólicos como la disfunción en el metabolismo de la insulina, la privación de glucosa, la hiponatremia, la anestesia y el estrés crónico (Arendt et al. 2016). Sin embargo, en un estado patológico la fosforilación de la proteína tau persiste en diversos sitios como en la serina (S) 199, 202, 396, 404, 422 y treonina (T) 205 y 231 (Mondragón-Rodríguez et al. 2008; Mondragón-Rodríguez et al. 2014), lo que favorece su acumulación citoplasmática que deriva en la disfunción sináptica y alteraciones en el transporte axonal, y durante etapas avanzadas en muerte neuronal (Aronov et al. 2001; Utton et al. 2005; Hinrichs et al.

2012). Aunque inicialmente ambas lesiones (placas de β A y MNFs) se reportaron como marcadores en la progresión de la enfermedad, actualmente se sabe que las MNFs correlacionan en mayor medida con el desarrollo de la EA (Braak and Braak 1991; Mondragón-Rodríguez et al. 2010). Los primeros cambios neuropatológicos ocurren en el lóbulo temporal medial (corteza entorrinal, subículum y la región CA1 de hipocampo), siendo los estadios I y II en la clasificación de Braak y Braak (1991), sitios donde se regulan el aprendizaje y la memoria episódica. Posteriormente se extienden al resto de las regiones del hipocampo, las áreas límbicas (cíngulo y corteza orbitofrontal) y las áreas de asociación (estadios III y IV) lo que explica la afectación de funciones ejecutivas, atención, lenguaje y memoria semántica. El daño culmina en áreas de asociación primaria en los lóbulos temporal, parietal y occipital (estadios V y VI) y explica las afectaciones viso-espaciales y constructivas (Braak and Braak 1991).

2.4 Fosforilación de la proteína tau

La proteína tau cuenta con alrededor de 85 sitios de fosforilación de los cuales 31 han sido descritos en condiciones fisiológicas, 16 se hallan fosforilados tanto en condiciones control como durante la patología y 28 que son exclusivamente fosforilados durante la EA (Martin et. al 2013). Asimismo, su fosforilación es regulada por la actividad balanceada de enzimas tipo cinasas y fosfatasas, por lo que la ruptura de este equilibrio ha sido sugerida como la causa de la fosforilación anormal de la proteína tau y su posterior acumulación.

Las cinasas pertenecen a un grupo de enzimas llamadas “transferasas” debido a que transfieren un grupo fosfato de una molécula de alta energía como adenosín trifosfato (ATP) o guanósín trifosfato (GTP) a sustratos específicos. La regulación de estas proteínas ocurre por cambios postraduccionales o interacciones con otras moléculas que pueden modificar su especificidad y su distribución intracelular (Martin et al. 2013).

Las cinasas que fosforilan tau pueden dividirse en tres grandes grupos: 1) cinasas dirigidas a prolina (PDPK, por sus siglas en inglés), 2) cinasas no PDPK y 3) tirosina cinasas (TPK, por sus siglas en inglés).

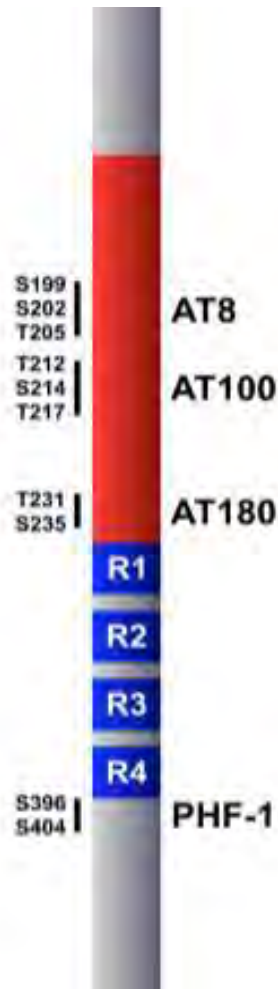


Figura 2. La proteína tau contiene múltiples sitios de fosforilación localizados en el dominio rico en prolina (rojo) y cerca de los dominios repetidos (azul), esquema modificado de Mondragón-Rodríguez et al., 2012).

Dentro del primer grupo se encuentra a la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3, por sus siglas en inglés), inicialmente descrita por su papel en el metabolismo del glucógeno (Embi et al. 1980; Rylatt et al. 1980; Welsh et al. 1993); se encuentra además involucrada en la proliferación celular, funciones neuronales, oncogénesis, desarrollo embrionario, apoptosis y vías de respuesta inmunitaria (Hooper et al. 2008; Rayasam et al. 2009). Se han descrito dos isoformas de la GSK3, α y β , que son codificadas por genes diferentes, pero que comparten 85% de su secuencia de aminoácidos, la fosforilación en serina 21 (S21) (para α) y en los residuos serina 9 (S9) y 389 (para la isoforma β) inhiben su actividad mientras que la fosforilación en tirosina 279 (para α) y 216 (para β) incrementa su actividad (Woodgett et al. 1990).

La fosforilación de tau por GSK3 ocurre en 42 sitios diferentes de los cuales 29 se han encontrado asociados a la EA (Hanger, Anderton et al. 2009). Además, la sobreexpresión de GSK3 en ratones transgénicos induce hiperfosforilación de tau que conduce a la neurodegeneración (Lucas et al. 2001)

En pacientes con EA la GSK β se co-localiza con las MNFs (Yamaguchi et al. 1996; Pei et al. 1997) y su forma activa incrementa en la corteza frontal de los cerebros de pacientes con esta patología (Leroy et al., 2007). Otras PDPK involucradas en la fosforilación de la proteína tau son: la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) la cual fosforila a tau en 11 sitios descritos en la EA; otra cinasa es p38 que en condiciones fisiológicas se activa como respuesta al estrés extracelular y exposición a citosinas (Thornton et al. 2008) y que fosforila 11 sitios de la proteína tau relacionados con la EA (Feijoo et al. 2005; Sergeant et al. 2008; Hanger, Anderton et al. 2009); las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ErK1 y 2, por sus siglas en inglés) que fosforilan a tau en 16 sitios relacionados con la EA (Feijoo et al. 2005; Sergeant et al. 2008; Hanger et al. 2009); y cuya actividad es regulada por el gen de la Presenilina 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2) (Dehvari et al. 2008) y quinasas c-Jun N-terminal (JNK) 1, 2 y 3 que han sido detectadas en los agregados de tau durante el desarrollo de la EA (Zhu, Rottkamp et al. 2000) y que además están involucradas en un incremento de la actividad de la γ - secretasa por lo que además pudieran estar relacionadas con la formación de placas de β A (Shen, Chen et al. 2008).

En la EA eventos postraduccionales tales como la fosforilación, cambios conformacionales y proteólisis en la proteína tau juegan un papel importante durante el desarrollo de la patología (Mondragón-Rodríguez et al. 2008). Se han propuesto varias secuencias por las cuales estos cambios puedan generar la maduración de las MNFs; la mayoría comparten un evento de carácter inicial: la fosforilación anormal de la proteína tau.

Sitios de fosforilación de la proteína tau			
Sitios fosforilados solo en cerebros con EA	Sitios fosforilados en cerebros control y con EA	Sitios fosforilados en condiciones fisiológicas	Sitios putativos
Y18	S46	T17	T30
S68	T181	Y29	S61
T69	S198	T39	T63
T71	S199	T50	S64
S113	S202	T52	T76
T123	T205	S56	S129
T153	T212	T95	S137
T175	T217	T101	Y310
T184	S235	T102	T319
T231	S400	T111	T377
S185	S404	S131	
S191	S412	T135	
Y197	S413	T149	
S208	S416	T169	
S210		S195	
S214		T220	
S237		S241	
S238		T245	
S258		T263	
S262		S285	
S289		S293	
S356		S305	
S396		S320	
Y394		S324	
T403		S341	
S316		S352	
S409		T361	
S422		T373	
T427		T386	
S433		T414	
S435			

Figura 3. Sitios de fosforilación de la proteína tau. Los sitios de fosforilación de la proteína tau están organizados por tipo de residuo: S: serina; T: treonina; Y: tirosina seguido del número de aminoácido de la proteína. (Modificado Martin et. al. 2013)

2.5 El hipocampo durante la EA

Una de las estructuras que inicialmente se afectan durante la EA es el hipocampo, esta estructura cerebral tiene un rol importante en la generación de nuevos recuerdos, tanto episódicos como autobiográficos (Eichenbaum et al. 2010; Squire et al. 2017), lesiones en esta zona producen incapacidad para generar nuevos recuerdos y afectación de los creados previos al daño (Squire et al. 2017); también se ha establecido una estrecha relación con la memoria espacial y la orientación; lo cual explica gran parte de la sintomatología del paciente con EA (Ekstrom et al. 2003).

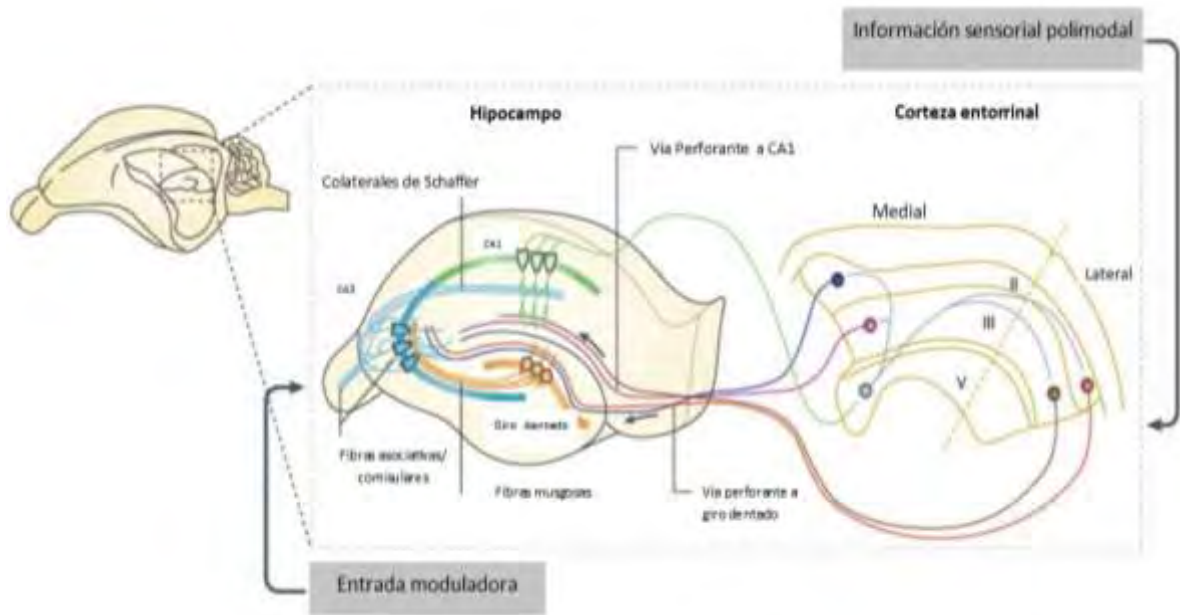


Figura 4. La mayor entrada de axones al hipocampo se da por la vía perforante con información sensorial de la capa II de la corteza entorrinal al giro dentado, los axones de esta vía hacen sinapsis de tipo excitatorio con las dendritas de las células granulares. Las células granulares proyectan sus axones (fibras musgosas) a las dendritas apicales de las células piramidales de CA3 que proyectan a las células piramidales de CA1 por las colaterales de Schaffer, Además las células de CA3 también están invadidas por la entrada directa de las células de la capa II de la corteza entorrinal y CA1 recibe aferencias de la capa III (Modificado de Neves et. al 2008).

La formación hipocámpal se encuentra en la región temporal medial, es una estructura bilateral, ubicada de manera subcortical y está conformada por tres estructuras básicas: el cuerno de Amón, que corresponde al hipocampo propiamente dicho (divido en tres áreas: CA1, CA2 y CA3); el giro dentado que se encuentra separado del hipocampo por la fisura hipocámpal, el complejo subicular (presubiculum, subiculum y parasubiculum), y la corteza entorrinal (Strange et al. 2014). Histológicamente cada zona tiene una distribución y morfología diferente; el giro dentado está formado por una capa denominada *stratum granulosum* donde residen los somas de las neuronas granulares cuyos axones conforman las fibras musgosas, la capa vecina a la fisura hipocámpal se denomina *stratum moleculare* y ahí se localizan las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares además de interneuronas y células gliales (Fig. 4); la capa más profunda del giro

dentado se designa hilus y tiene una naturaleza polimórfica (compuesta de una gran variedad de tipos neuronales).

Entre la capa molecular y el hilus se encuentra una fina capa la subgranular que está compuesta de precursores neuronales (Swanson et al. 1979). El hipocampo propiamente dicho está conformado por las tres áreas que mencionamos anteriormente, CA1 se caracteriza por contener células piramidales pequeñas, mientras que CA2 y CA3 es rica en células piramidales de mayor tamaño.

Las distintas áreas se encuentran estratificadas; en la capa más interna encontramos la capa del *alveus* o sustancia blanca, después la capa *oriens* formada por las dendritas basales de las células piramidales que conforman la capa piramidal (neuronas de naturaleza glutamatérgicas). A continuación, se encuentra la capa *radiatum*, formada por las dendritas apicales de estas mismas neuronas y en la parte más exterior se encuentra el *estratum lacunosum-moleculare* que contiene las ramificaciones más distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Sólo en el área CA3 entre las capas piramidal y *radiatum* se observa un estrecho estrato acelular formado por las dendritas apicales de las piramidales de CA3, el *stratum lucidum*, con sitios postsinápticos modificados como las excrecencias espinosas y en las que se establecen conexiones con las fibras musgosas del giro dentado (Swanson et al. 1979).

2.6 La corteza entorrinal y la región septal

La corteza entorrinal se encuentra dividida en seis capas bien definidas, en las capas II y III se encuentran las neuronas pequeñas que se proyectan hacia el hipocampo; y las capas V y VI están formadas por neuronas grandes que envían sus proyecciones fuera de la formación hipocampal y las capas I y IV acelulares

La principal entrada de fibras al hipocampo proviene de las cortezas: parahipocampal (entrada de aferencias originadas de la corteza parietal posterior); retrosplenial, y la dorsolateral o de la parte dorsal del surco temporal superior. Las aferencias se proyectan de las capas II y III de la corteza entorrinal hacia el giro dentado y el hipocampo por la vía perforante, penetrando a la capa de células piramidales del subículum. Por otro lado, las neuronas piramidales de CA3 proyectan axones a la región CA1 a través de las colaterales de Schaffer; además

los axones de CA3 también se proyectan hacia todo el hipocampo mediante proyecciones comisurales (contralaterales). Mientras tanto las neuronas granulares del giro dentado guían sus axones o fibras musgosas a las dendritas proximales (*stratum lucidum*) de las neuronas piramidales de la región CA3 atravesando el hilus (Swanson et al. 1979).

La región septal entre los cuernos anteriores de los ventrículos laterales se prolonga de manera ventral, para formar una parte de la región preóptica del hipotálamo, y tiene funciones análogas a los sistemas corticales hipocampal y olfatorio por lo que se considera una estación intermedia entre las vías de doble dirección que unen la formación hipocampal con el hipocampo y con otros circuitos del sistema límbico (Puelles et al. 2008). El área septal puede ser dividida en cuatro partes por su citoarquitectura y conexiones: una división lateral que consiste en el núcleo septal lateral y la división medial que dorsalmente se compone del núcleo septal medial y ventralmente del núcleo de la banda diagonal de Broca (MS-DBB); la división posterior consta de los núcleos septo-fimbrial y triangular, y la división ventral compuesta del núcleo del lecho de la estría terminal y del núcleo del lecho de la comisura anterior (Swanson et al. 1979; Puelles et al. 2008). Desde el punto de vista neuroquímico, el septum está constituido principalmente por dos tipos de neuronas: GABAérgicas y colinérgicas aunque recientemente se ha descrito un tercer grupo de neuronas de naturaleza glutamatérgica (Robinson et al. 2016).

La vía descendente va del hipocampo al septum, pasando por el fórnix y termina en el núcleo septal lateral, de éste se originan proyecciones que forman el tracto prosencefálico medial que llega a la región preóptica, al hipotálamo medial y lateral, a la región mamilar, al área tegmental ventral y a la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo; varias de estas proyecciones, regresan al mismo septum pero al núcleo septal medial y posteriormente conducen vía fórnix al hipocampo y a la corteza entorrinal cerrando así el circuito hipocampo-septo-hipotálamo-septo-hipocampal (Puelles et al. 2008).

2.7 Actividad cerebral theta

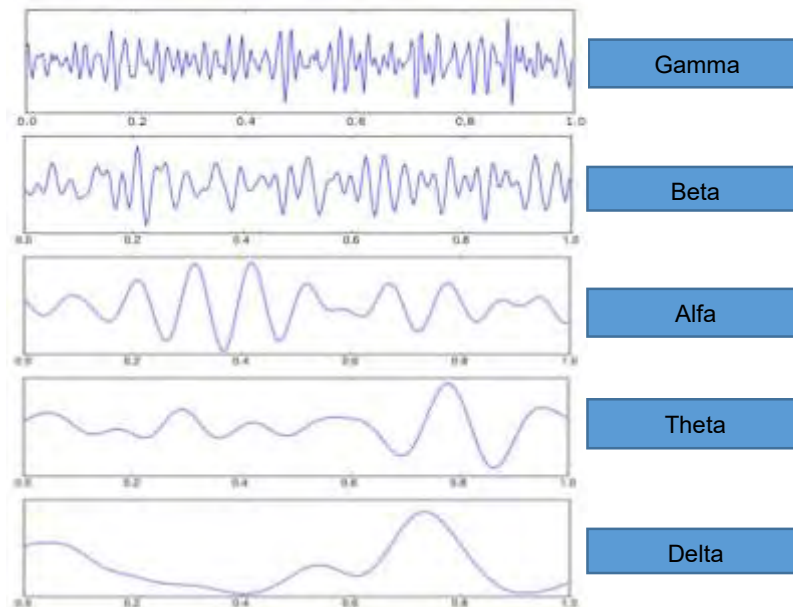


Figura 5. Espectro de frecuencias de la actividad eléctrica del cerebro, oscilaciones delta (1-2 Hz), theta (2-10 Hz), alfa (10-12 Hz), beta (13-30 Hz) y gamma (31-80 Hz) cada una ha sido asociada en el ser humano a diferentes funciones cerebrales (modificado de Mathalon y Sohal, 2015).

La actividad theta es un patrón de oscilación neuronal cuya frecuencia promedio va de los 2 y 12 Hz, su presencia depende del comportamiento del individuo y aunque no existe un consenso actual respecto a cuáles comportamientos se encuentran asociados, la actividad theta está presente durante el sueño de movimientos oculares rápidos (REM por sus siglas en inglés) y otras actividades del tipo movimiento voluntario como la preparación, la orientación y la exploración (Buzsaki et. al 2002). La actividad theta además se ha asociado a la modulación de otra actividad oscilatoria denominada gamma, cuya frecuencia va de los 30 y 100 Hz, y la acción conjunta de ambas ha sido positivamente asociada a la memoria y al aprendizaje (Li et al. 2012; Alekseichuk et al. 2016).

Hasta hace poco, se suponía que la mayor contribución en la generación del ritmo theta estaba dada por el septum medial y MS-DBB, que como mencionamos anteriormente forman un circuito con la formación hipocampal que resulta esencial en el mantenimiento del ritmo theta (Buzsaki et al.2002); sin embargo, otros estudios

han reportado que el ritmo theta del hipocampo surge de una combinación de oscilaciones theta intrínsecas y entradas de múltiples áreas del cerebro (Buzsaki et al. 2002; Goutagny et al. 2013).

El mecanismo subyacente en la generación de theta permanece incompleto debido a numerosas razones; la mayor parte de información de theta proviene de estudios *in vivo* que no permiten realizar aplicaciones farmacológicas tan precisas y de registros unicelulares que requieren animales anestesiados lo que implica la adquisición de datos que deben manejarse de manera reservada debido a que la mayoría de los anestésicos utilizados en la investigación de theta afectan la transmisión sináptica (Vanderwolf et al. 1998; Klausberger et al. 2003; Hemmings et al. 2005; Hentschke et al. 2007). Aunado a lo anterior, la generación de theta puede estar influenciado por múltiples aferencias que convergen en el hipocampo (Vertes et al. 2004), lo cual no permite aclarar el papel específico de la estructura en una situación *in vivo*. Debido a esto, surge la necesidad de estudiar al hipocampo en un contexto en el que se aísle, en la medida de lo posible, de otras regiones cerebrales pero preservando los circuitos intrínsecos de la estructura necesarios para la generación de la actividad theta (Manseau et al. 2008).

De manera importante, se sabe que la actividad oscilatoria del cerebro es crítica para la función cognitiva y se altera en pacientes con patologías como la EA (Herrmann et al. 2005; Czigler et al. 2008; van Deursen et al. 2008). La evidencia reciente sugiere que la acumulación de β A soluble induce alteraciones en la conectividad del hipocampo (Goutagny et al. 2013); adicionalmente se ha reportado que cambios finos en la actividad pueden estar presentes en fases previas a la agregación de β A (Goutagny et al. 2013); hasta la fecha no existen este tipo de estudios enfocados en la participación de la proteína tau en la actividad oscilatoria en fases previas a la agregación (Goutagny et al. 2013).

2.8 Mutaciones genéticas asociadas al desarrollo de la EA

Las principales mutaciones genéticas asociadas a la EA se encuentran en los genes que codifican para la APP y los genes PSEN1 y PSEN2, todas ellas relacionadas con el procesamiento anormal de la proteína β A que se traduce en su agregación (Mondragón-Rodríguez et al. 2010; Rongve et al. 2013; Lanoiselee et al. 2017); lo

que promueve neurotoxicidad a través de diversas vías tales como la activación de la apoptosis vía JNK-c-Jun-FasL-caspasa (Bogoyevitch et al. 2004), la generación de especies reactivas de oxígeno por la activación de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (Colell et al. 2009) o la producción de estrés oxidativo vía mitocondrial; y sinaptotoxicidad inducida por una pérdida en la regulación de la proteína cinasa C (PKC) y la transmisión GABAérgica debido a una disminución en la disponibilidad del receptor de cinasa C activada 1 (RACK1) en la membrana. Estos cambios conllevan a la disfunción y déficit en la transmisión sináptica y muerte neuronal (Shelat et al. 2008; Li et al. 2009).

Por otra parte y debido a que la acumulación de la proteína tau no ocurre únicamente en la EA sino también en otras patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Pick o la demencia frontotemporal (Lee et al. 2001; Goedert et al. 2006; Ballatore et al. 2007) las mutaciones asociadas a su rol patológico han sido descritas en varios desórdenes.

La primera mutación descrita de tau, FTDP-17, fue definida en demencia frontotemporal y parkinsonismo asociado al cromosoma 17 (Hutton et al. 1998; Poorkaj et al. 1998). Actualmente se conocen al menos 37 mutaciones de la proteína (Wolfe et al. 2009), entre ellas cobran especial relevancia las que afectan su splicing en el exón 10, región que define las isoformas de tau con diferente número de dominios repetidos (4R o 3R) (Goedert et al. 1989; Goedert et al. 1990), provocando un incremento o disminución en la proporción 4R/3R que se sugiere es crítico en la función de la proteína (D'Souza et al. 1999; Stanford et al. 2000). Un aumento de la isoforma 4R promueve una mayor asociación a los microtúbulos, que termina por saturarlos provocando una disociación que hace propensa a tau de hiperfosforilación y acumulación (Goedert et al. 2005); mientras que un aumento de la isoforma 3R induciría una menor interacción con los microtúbulos y la acumulación citoplasmática de tau con autoagregación como consecuencia. (Goedert et al. 2005).

Otro tipo de mutaciones pueden disminuir la habilidad de la proteína de interactuar con los microtúbulos por alteraciones en los dominios repetidos (Spillantini et al. 2000; LeBoeuf et al. 2008); facilitar la unión de tau a los

microtúbulos (S305N y Q336R)(LeBoeuf et al. 2008) o le confieren la habilidad a tau de formar filamentos (R5L, K257T, I260V, G272V, K280, P301L, P301S, G335V, Q336R, V337M, and R406W) (Goedert et al. 1996; Nacharaju et al. 1999; Gamblin et al. 2000; LeBoeuf et al. 2008).

2.9 Modelos transgénicos

Queda claro que el origen, desarrollo y abordaje de la EA esgrime una alta complejidad que provoca limitaciones en su estudio. En este sentido el desarrollo de modelos transgénicos que desarrollan la patología, representa una herramienta ideal para el estudio de la variedad de alteraciones que se generan en esta enfermedad por lo que su uso es de gran importancia (Ahmad-Annur et al. 2003).

Existe una gran variedad de modelos basados en las mutaciones de APP, la mayoría desarrolla placas de β A a partir de los 6 meses de edad como el APP23 (Sturchler-Pierrat et al. 1997) o el PDAPP (Games et al. 1995), pero existen modelos más agresivos como el TgCRND8 que lo hace a los 3 meses (Janus et al. 2000). La limitación que presentan estos modelos en el estudio de la EA es que no desarrollan las lesiones de tau (MNFs) y no se observa pérdida neuronal en la corteza entorrinal o CA1 regiones, que como describimos previamente, resultan claves en el desarrollo de la EA (Calhoun et al. 1998).

Con la misma limitante de presentar solo un aspecto de la enfermedad también han sido desarrollados modelos basados en la mutación de PSEN como los PSEN1M146V, PSEN1M146L (Duff et al. 1996) o PSAPP Tg2576xPSEN1M146L que es un ratón bigénico y cuyo gen mutado de PSEN1 acelera de manera exclusiva la patología de tipo amiloide (Holcomb et al. 1998).

Dentro de los modelos basados en mutación de la proteína tau existen aquellos que expresan la isoforma 4R humana como los TauR406W (Tanemura et al. 2001) y los Htau (Andorfer et al. 2003). Existen otros que presentan mutación en 4R como los JNPL3, primer modelo transgénico con presencia de MNFs y pérdida celular que demostró su capacidad de producir daño celular (Zhang et al. 2004), y los TauV337M que son el primer modelo animal que presenta alteraciones en el comportamiento debido al desarrollo de MNFs (Takashima et al. 2001).

Aunque los modelos anteriormente mencionados cubren algunas partes específicas de la patogenia de la EA es por la misma razón que presentan serias limitaciones. El modelo de ratón triple transgénico (3xTg-AD) parece tener una relevancia fisiológica respecto al resto por lo siguiente: los ratones muestran depósito β A dependiente de la edad, su deposición inicial es en las regiones corticales y posteriormente en el hipocampo mientras que la formación de MNFs que inicia en las estructuras límbicas y continúa en las corticales imitan el patrón de progresión característico de la EA (Mesulam et al. 1999); adicionalmente se afectan regiones específicas (hipocampo, amígdala y corteza cerebral), en concordancia con lo encontrado en pacientes con la EA (Oddo et al. 2003).

Además, una gran ventaja que parece proveer el 3xTg-AD, es que los transgenes introducidos en el animal no alteran ni mezclan su fondo genético; lo cual implica evitar una importante variable de confusión en experimentos de conducta, blancos terapéuticos y electrofisiológicos (Oddo et al. 2003). Finalmente, la penetrancia del fenotipo es del 100% lo que implica que tanto machos como hembras se ven afectados de igual manera (Oddo et al. 2003), se ha reportado que la disfunción sináptica precede, en este modelo, al desarrollo de las lesiones características, condición que se correlaciona mejor con los déficits cognitivos que la presencia de placas de β A o las MNFs (DeKosky et al. 1990; Terry et al. 1991; Dickson et al. 1995).

Aunque el β A y la proteína tau se han descrito como dos factores importantes en la patogenia de la EA, la mayor parte de los estudios se han centrado en el rol del β A excluyendo los efectos que pudiera tener la proteína tau en la modulación de la transmisión sináptica (Shipton, Leitz et al. 2011).

Existen estudios que han mostrado no solo la presencia de la proteína tau en las dendritas (Mondragón-Rodríguez 2012), sino también que la fosforilación de ésta depende de la activación del receptor NMDA, sugiriendo que su estado de hiperfosforilación forma parte de una cascada de señalización interna regulando la transmisión sináptica mediada por este receptor y que adicionalmente funciona como un mecanismo regulatorio para la actividad del mismo (Mondragón-Rodríguez et al. 2012). En resumen, los datos sugieren que incrementos en los niveles de

fosforilación en la proteína tau pudiesen estar modificando la respuesta de los circuitos neuronales contribuyendo al proceso de neurodegeneración durante etapas muy tempranas.

3. Planteamiento del problema

Pueden encontrarse alteraciones en los circuitos neuronales previos a la presentación clínica y la agregación de las proteínas tau y β A en modelos transgénicos que presentan la triple mutación. Sin embargo, no existen datos experimentales que evalúen si las mutaciones en éstos logran modificar o alterar el funcionamiento de los distintos circuitos neuronales, particularmente los circuitos del hipocampo. Estos datos serán de vital importancia para comprender el mecanismo de patogénesis en el desarrollo de padecimientos de tipo neurodegenerativo como la patología de Alzheimer. Por tal motivo, en este proyecto se estudian las potenciales alteraciones a nivel de circuitos neuronales hipocampales en el modelo triple transgénico (3xTg-AD) y su potencial correlación con cambios en los patrones de fosforilación de la proteína tau.

4. Hipótesis

En etapas tempranas de los procesos neurodegenerativos que experimenta el ratón triple transgénico de la EA, la proteína tau hiperfosforilada, en su fase previa a la agregación, modifica la función de las neuronas piramidales del hipocampo alterando la actividad de los diversos circuitos neuronales que controlan y regulan la actividad theta.

5. Objetivo general

Estudiar las potenciales alteraciones de la actividad cerebral en la frecuencia de theta durante etapas iniciales de la neurodegeneración en un modelo triple transgénico y su correlación con la fosforilación de la proteína tau.

6. Objetivos específicos

1. Estandarizar la preparación septo-hipocampal para el registro de actividad neuronal theta.
2. Evaluar las alteraciones a nivel de actividad oscilatoria theta en el modelo triple transgénico.

3. Analizar las alteraciones cognitivas en etapas tempranas de neurodesarrollo en el ratón triple transgénico de la EA

4. Evaluar las alteraciones en los patrones de fosforilación de la proteína tau en el ratón triple transgénico de la EA

7. Metodología científica

7.1 Disección

Todos los procedimientos fueron realizados bajo las normas del Comité de Bioética de la UNAM. Ratones 3xTg-AD y No transgénicos (Non-Tg) fueron decapitados a diferentes edades (P25-P35), el cerebro fue extraído del cráneo y colocado en solución de sacarosa a punto de congelación que contiene: sacarosa (238mM), glucosa (30mM), NaHCO₃ (25mM), KCl (3mM) y MgCl₂ (2.5mM) y gaseado con O₂ (95%) y CO₂ (5%). La región cerebral de interés se aisló del resto de las estructuras y se mantuvo en la solución de 30 a 40 minutos para estabilizar el tejido. La extracción total de las estructuras se llevó a cabo en un tiempo inferior a 60 segundos.

7.2 Registros electrofisiológicos

La preparación se transfirió a una cámara de registro donde bajo perfusión con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) oxigenado que contiene (en mM): 119 NaCl, 30 glucosa, 25 NaHCO₃, 3 KCl, 2.5 MgCl₂ y 1.5 CaCl₂; a un flujo de 25ml/min y temperatura constante de 30-32°C. Los potenciales locales de campo fueron registrados utilizando micropipetas de vidrio llenas con ACSF con una resistencia de 4MΩ. Dicha actividad fue registrada mediante el uso de amplificadores AC (A-M System), con distintos filtros (0.1 -500 Hz) y muestreo a 5KHz.

7.3 Análisis de registros electrofisiológicos

Los datos electrofisiológicos fueron digitalizados, analizados y graficados utilizando pClamp y MATLAB. Los espectrogramas fueron obtenidos usando la caja de herramientas de Chronux (*Chronux tool box, time frequency bandwidth of 2 with 3 tapers*). La máxima amplitud y frecuencia dominante de las oscilaciones en las diferentes regiones hipocampales fue medida a través de la detección del pico máximo promedio detectado en el espectrograma. Los registros contendrán en promedio 10 a 15 minutos por sesión.

7.4 Prueba de conducta

Se colocaron en las cajas de los ratones 3xTg-AD (28 ± 7 días, $n = 10$) y Non-Tg (30 ± 4 días, $n = 10$), tubos de excavación rellenos con 200g de alimento (para evitar el fenómeno de neofobia).

Durante la primera parte de la prueba se colocó un solo tubo de excavación en una caja con todos los sujetos de experimentación con la finalidad de que los ratones realizaran la primera sesión en grupo y disminuir la variabilidad entre animales.

Una vez que se estableció el punto de referencia de la prueba, se separó a cada animal en cajas individuales, se colocó un tubo de excavación en cada una de ellas tres horas antes del ciclo de oscuridad; dos horas después se pesó el material excavado por el animal. Se colocaron nuevamente 200g de alimento en el tubo de excavación y se pesó el material excavado en una sesión de 12 horas.

7.5 Histología

Posterior a las pruebas, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50mg/kg, intraperitoneal), perfundidos con una solución buffer fosfatos (PBS) al 0.1M seguido de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 0.1M (pH 7.4); los cerebros fueron extraídos y fijados durante 24 horas en PFA 4%, seguido de un periodo de incubación en sacarosa al 30% hasta punto de saturación. El tejido fue seccionado a -21°C en un criostato ($40\mu\text{m}$).

Cada corte histológico, fue bloqueado por una hora con buffer de suero normal de burro (NDS) 3% + Tritón X-100 0.3% en PBS al 0.1M, posteriormente fueron incubados durante 12 horas a 4°C con el anticuerpo primario para la proteína tau fosforilada en el sitio S396 (anticuerpo policlonal rabbit, ThermoFisher, 1:50) y T231 (anticuerpo monoclonal mouse, ThermoFisher, 1:100).

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 y Anti Rb IgG), acoplados a diferentes fluoróforos; verde (FITC/alexa 488), rojo (TRITC/alexa 596) y azul (Cy5) (Invitrogen, CA y Molecular Probes, USA). La incubación se realizó durante dos horas a 4°C ,

finalmente se realizó montaje y deshidratación del tejido (con C₂H₅OH al 70, 95 y 100% y Xileno al 100%).

Las laminillas se observaron en un microscopio Axio Imager 2 marca ZEISS, se analizaron las diferentes regiones del hipocampo y se obtuvo la inmunofluorescencia relativa de las regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés) con ayuda del software ZEN 2012 LITE.

7.6 Western Blot

Después de cada registro el tejido, fue colocado en un tubo congelado y homogenizado en buffer de lisis a punto de congelación que contiene: 50mM Trizma Base, 150mM NaCl, 1% Tritón X-100, 0.5% SDS, 25mM NaF, 1mM Na₄P₂O₇, 10mM Na₃VO₄, 20mM β- glicerofosfato e inhibidores de las proteasas. Las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 10,000rpm y almacenadas a -80°C. Para la electroforesis, el homogenizado fue hervido por 8 minutos y centrifugado por 3 minutos a 14,000rpm después de añadirle 2X buffer Laemmli; cada muestra fue cargada en un gel SDS-PAGE al 10%. Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de polifluoroforo de vinilideno (PVDF) y fue incubada por 2 horas en buffer de bloqueo que consiste en TBS-T (20mM Trizma base, 137mM NaCl y 0.5% Tween, pH 7.6) y 5% de leche en polvo sin grasa.

Posteriormente, las membranas fueron incubadas con los siguientes anticuerpos primarios: para la proteína tau fosforilada en el sitio S396 (policlonal rabbit, ThermoFisher, 1:1000) y T231 (monoclonal mouse, ThermoFisher, 1:1000); para la proteína tau total (monoclonal mouse, Invitrogen, 1:1000), para GSK3 α/β (Ser21/9) (policlonal rabbit, Cell Signaling Technology) y GSK3β total (monoclonal rabbit, Cell Signaling Technology) diluidos en TBS-T a 4°C por 12 horas, después las membranas fueron lavadas con TBS-T e incubadas con anticuerpos secundarios: goat anti-rabbit IgG-HRP Ab (Santa Cruz Biotechnology) y anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase (Invitrogen) a una dilución de 1:5000 en TBS-T por 2 horas. Las proteínas fueron visualizadas usando Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology).

La cuantificación de las proteínas fue llevada a cabo escaneando las fotografías y calculado la densidad óptica (DO) con software ImageJ, para obtener

los radios la DO de las formas fosforiladas fue dividida entre la DO de las formas totales.

7.7 Estadística

Para el análisis de los registros electrofisiológicos de campo se evaluó la distribución de los datos mediante la prueba de Shapiro–Wilk, con distribuciones normales se comparó la potencia y frecuencia de ambos grupos mediante prueba t-student; las mismas pruebas fueron utilizadas para evaluar la cantidad de material excavado por los animales en la tarea conductual de Burrowing.

En el caso del análisis de Western Blot e inmunofluorescencia, la prueba de elección fue Mann-Whitney.

8. Resultados

8.1 Preparación septo-hipocampal para el registro de actividad neuronal theta.

Con la finalidad de evaluar las posibles alteraciones eléctricas en la actividad oscilatoria del hipocampo, se utilizó una preparación septo-hipocampal que preserva todas las proyecciones septo-hipocampales (GABAérgicas, colinérgicas y glutamatérgicas) (Manseau et al. 2008; Robinson et al. 2016),

Los ratones 3xTg-AD y los Non-Tg fueron decapitados para llevar a la cabo la extracción del cerebro, se realizaron dos cortes a nivel de cerebelo y corteza prefrontal (Fig. 6A) se realizó un corte sagital para separar los hemisferios; se tomó uno de estos y por la línea media se localizó el septum medial y la banda diagonal del Broca (MSDDB por sus siglas en inglés), con ayuda de una espátula roma se tomó un punto de apoyo en la corteza para evitar el movimiento y con una espátula cortante se realizó una incisión con entrada en el ventrículo lateral para liberar MSDDB del tálamo (Fig. 6B). A continuación, se llevó a cabo un corte en la corteza para separar el MSDDB en su extremo contralateral (Fig. 6C); una vez que el MSDDB queda libre se procede a exponer el hipocampo unido al septum por el fórnix para lo cual con ayuda de una espátula se retira el tálamo y el resto del tronco cerebral (Fig. 6D).

Una vez confirmado que las conexiones entre el hipocampo y el MSDDB están preservadas (Fig. 6D), se procedió a insertar una espátula cortante por debajo

del MSDDDB continuando el corte hasta por debajo del hipocampo (Fig. 6E), en ese punto se realizó un giro para separar por completo el hipocampo de la corteza subyacente obteniéndose la preparación septo-hipocampal (Fig. 6F), se realizó un corte en la corteza remanente dejando una pequeña porción de ésta que sirvió de punto de apoyo en la cámara de registro.

En resumen, la estandarización de la preparación septo-hipocampal nos permitió evaluar el estado sináptico de este circuito, sin la intervención de otras aferencias en un modelo de la enfermedad de Alzheimer durante etapas tempranas del desarrollo de la patología.

Figura 6

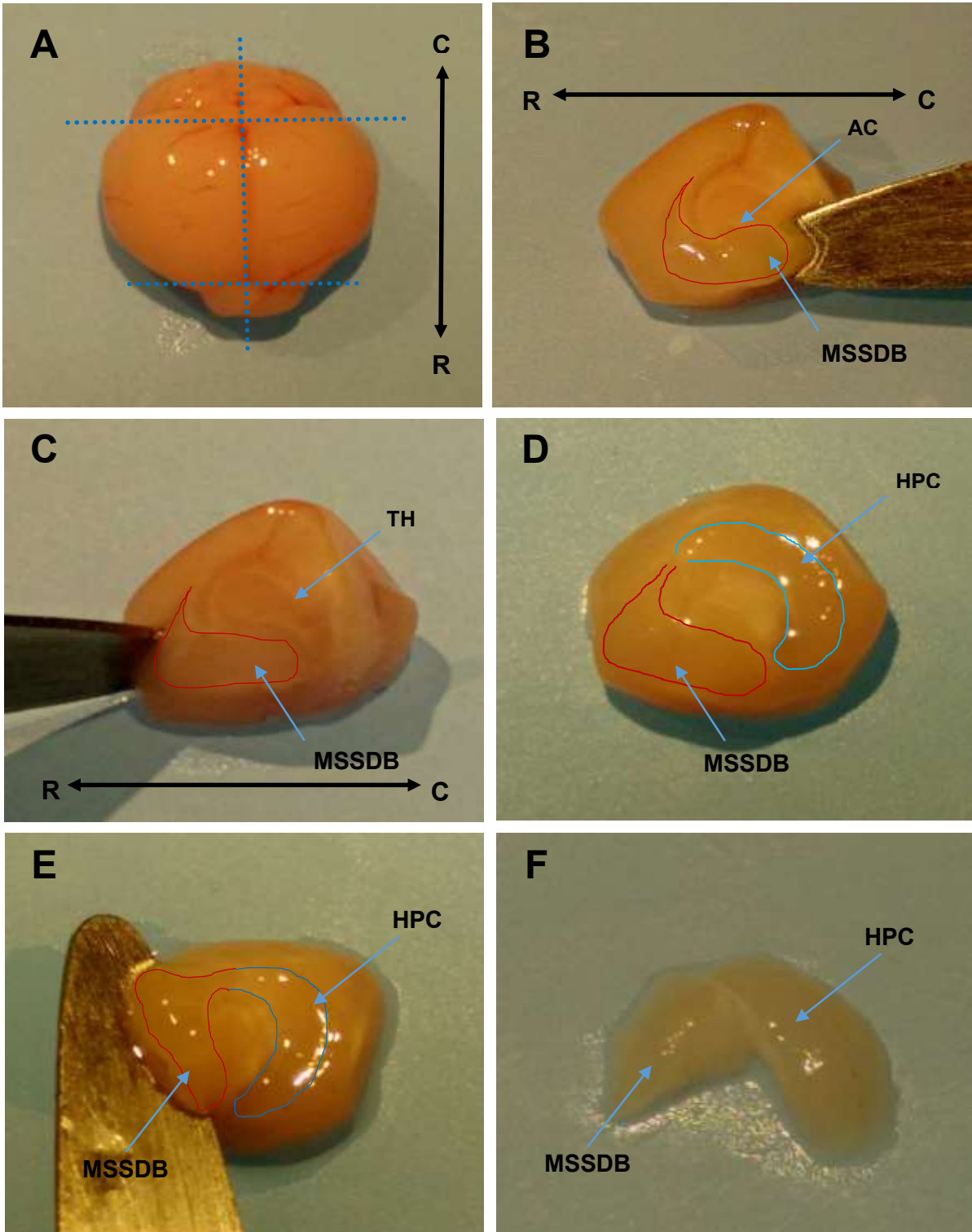


Figura 6. Secuencia de pasos para aislar el complejo septo-hipocampal intacto A. Cerebro de ratón (P30), con líneas punteadas se observan los cortes coronales y sagital para remover cerebelo, corteza prefrontal y dividir los hemisferios respectivamente (R Rostral y C Caudal) B y C.- Inserción de espátula en ventrículo lateral para liberar el septum medial y lateral del estriado circundante (AC Comisura anterior, MSSDB Septum medial y banda diagonal de Broca, TH Tálamo) D. Remoción del tálamo y exposición del complejo septo-hipocampal E. Movimiento anteroventral de la espátula para aislar la preparación (HPC Hipocampo) F.- Preparación septohipocampal.

8.2 Alteración de potencia en la actividad theta hipocámpal en el modelo 3xTg-AD

Con la finalidad de evaluar si existían alteraciones en los principales componentes de la actividad oscilatoria en la frecuencia theta, se realizó un estudio comparativo entre el 3xTg-AD y el Non-Tg registrando en la región CA1 medial del hipocampo. La actividad theta puede ser evaluada a través de registros de campo en la preparación septo-hipocámpal previamente estandarizada.

Los registros se realizaron en los ratones transgénicos (29.0 ± 4 días, $n=4$) y Non-Tg (31 ± 2 días, $n=5$), los resultados muestran actividad theta espontánea en ambos grupos como se observa en los trazos representativos (Figs. 7A-B). Los trazos filtrados comprueban la presencia de la actividad oscilatoria en frecuencia de theta en ambos grupos (Figs. 7C-D). En añadidura es posible observar que los ratones 3xTg-AD presentan patrones rítmicos distintos cuando se compara con los Non-Tg (Figs. 7C-D).

Los espectrogramas de potencia revelaron un aumento de la potencia en el grupo de los 3xTg-AD respecto a los Non-Tg (Figs. 7E-F). Mientras que los picos de frecuencia de la actividad oscilatoria theta permanecen constantes y similares en ambos grupos (Figs. 6G y H). Así mismo, se evidencia un incremento en el pico máximo de theta en el ratón 3xTg-AD en comparación con el Non-Tg (Figs. 7I-J).

El análisis estadístico no reveló diferencia significativa entre la frecuencia de las oscilaciones theta de los ratones 3xTg-AD en comparación con los Non-Tg ($n=4,5$ para cada grupo, medias para 3xTg-AD de 2.62 ± 0.189 Hz y para Non-Tg 2.48 ± 1.74 Hz, con un valor de $\alpha 0.05$, $p=0.872$, Fig. 7K). Sin embargo, la potencia se encontró significativamente aumentada en los ratones 3xTg-AD respecto al grupo Non-Tg ($n=4,5$ para cada grupo, con media para Non-Tg de $7.95 \times 10^{-6} \pm 4.23 \mu V^2$ y para el 3xTg-AD $2.15 \times 10^{-7} \pm 1.7 \times 10^{-7} \mu V^2$, con un valor de $\alpha 0.05$, $p=0.02$, Fig. 7L).

Los resultados del análisis de los registros electrofisiológicos demostraron que existen alteraciones en los circuitos implicados en la generación del ritmo theta a nivel de potencia entre los ratones 3xTg-AD y Non-Tg.

Figura 7

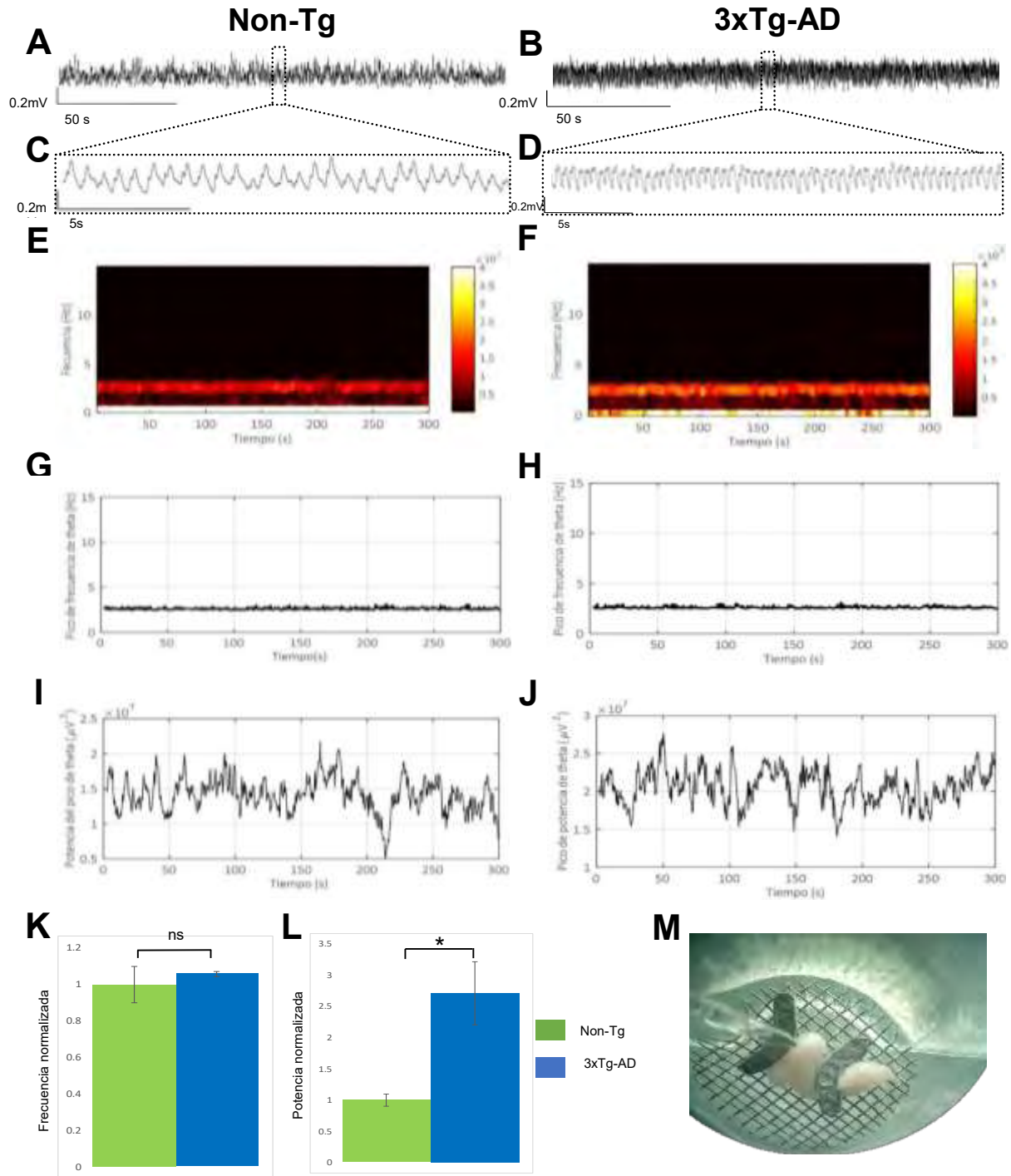


Figura 7. Registros electrofisiológicos. **A y B.** Trazos crudos de actividad theta del ratón Non-Tg (derecho) y 3xTg-AD (izquierdo) **C y D.** Trazos ampliados de la actividad theta Non-Tg (derecho) y 3xTg-AD (izquierdo) **E y F.** Espectrogramas de potencia de actividad theta registrada en Non-Tg (izquierdo) y 3xTg-AD (derecho) **G y H.** Frecuencia máxima de theta en Non-Tg (izquierdo) y 3xTg-AD (derecho)– **I y J.** Potencia máxima de theta en el ratón Non-Tg y 3xTg-AD **K.** Frecuencia normalizada al control de ambos grupos **L.** Potencia normalizada al control de ambos grupos. **M.** Preparación septo-hipocámpal en cámara de registro de campo.

8.3 Ausencia de alteraciones cognitivas en el modelo 3xTg-AD

Como previamente se mencionó, la EA se caracteriza histopatológicamente por dos lesiones: las placas de β A y las MNFs formadas por proteína tau anormalmente fosforilada (Mondragón-Rodríguez et al. 2016); que se correlacionan con alteraciones cognitivas (Braak and Braak 1991). Sin embargo, se ha propuesto que las alteraciones a nivel de circuitos pudieran estar precediendo al deterioro cognitivo (Goutagny et al. 2013). En este sentido decidimos evaluar tareas hipocampo-dependientes en el ratón 3xTg-AD.

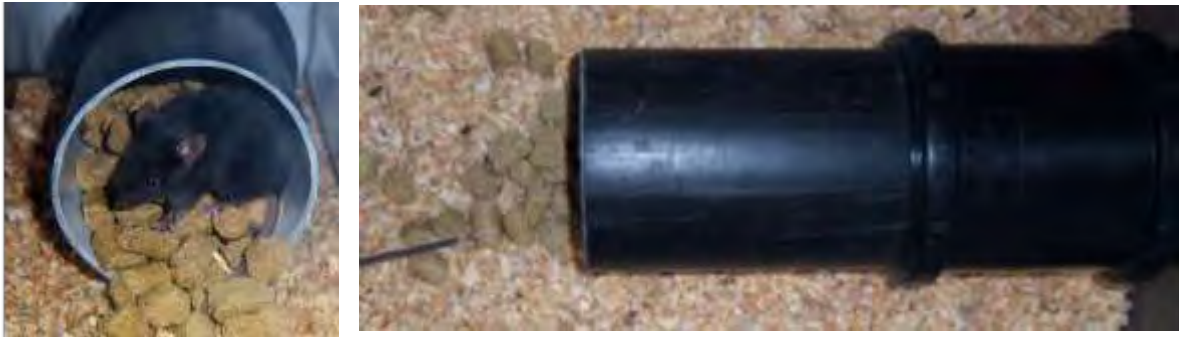
En la figura 8A del lado izquierdo se observa al animal Non-Tg realizando la tarea de excavación y del lado derecho uno de los tubos de excavación con la cantidad de material excavado por el mismo animal en la sesión de 12 horas.

El análisis de estos resultados evidenció que no existían diferencias detectables en la cantidad de material excavado entre ambos grupos. Durante la sesión de 2 horas el volumen desplazado se mantuvo constante entre ambos grupos ($n=10$ para cada grupo, medias para el Non-Tg de 46.9 ± 7.015 gramos y para el 3xTg-AD y 43.2 ± 6.552 gramos, con un valor de $\alpha 0.05$, $p=0.7044$, (Fig. 8B). El análisis estadístico reveló que en la sesión de 12 horas tampoco existió diferencia significativa entre grupos (medias para el Non-Tg de 90.55 ± 14.41 gramos y para el 3xTg-AD de 90.15 ± 14.04 gramos, con un valor de $\alpha 0.05$, $p=0.9844$, Fig. 8C).

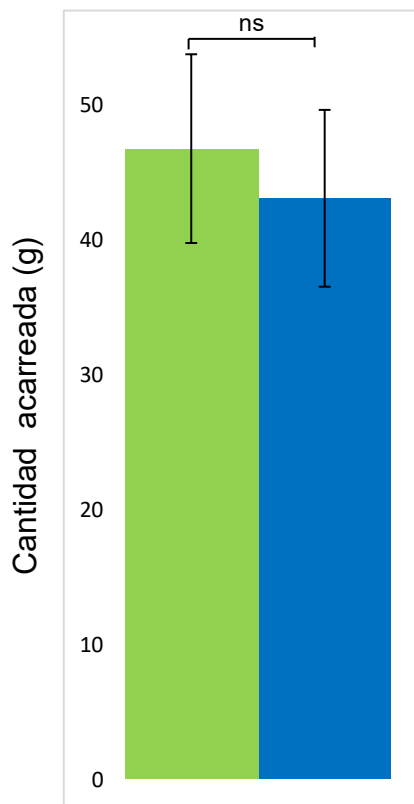
Estos datos permitieron concluir que no existen alteraciones hipocampo-dependientes en el modelo 3xTg-AD.

Figura 8

A



B Burrowing (2h)



C Burrowing (12h)

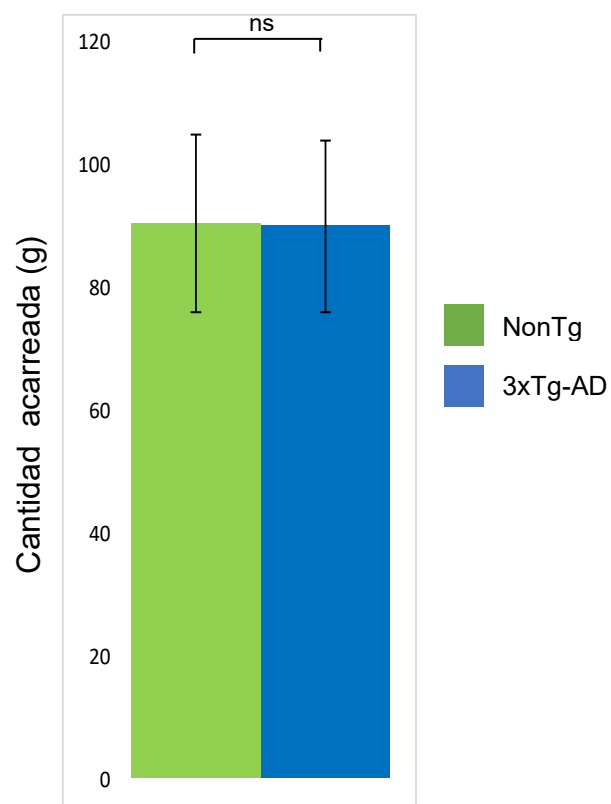


Figura 8. Burrowing test. A Figura representativa de la prueba, ratón Non-Tg en los tubos de excavación (izquierdo) y cantidad excavada por el animal durante 2 horas (derecho) B. Material excavado durante sesión de 2 horas por cada ratón ($n=10$ para cada grupo, medias del Non-Tg 46.9 gramos y 3xTg-AD 43.2 gramos, con un valor de α 0.05, las muestras no presentaron diferencia significativa, $p=0.7044$, $df=18$, t test) C. Material excavado durante la sesión de 12 horas por cada ratón ($n=10$ para cada grupo, medias del Non-Tg 90.55 gramos y 3xTg-AD 90.15 gramos, con un valor de α 0.05, las muestras no presentaron diferencia significativa, $p=0.9844$, t test)

8.4 Hiperfosforilación de la proteína tau en el modelo 3xTg-AD

La hiperfosforilación de la proteína tau en sitios específicos ha sido descrita como promotora de la agregación de la misma en las MNFs que caracterizan a la EA (Braak and Braak et al. 1991; Mondragón-Rodríguez et al. 2010), en su fase de agregación se ha relacionado con neurodegeneración, alteración del transporte axonal y disfunción sináptica (Aronov et al. 2001; Utton et al 2005; Hinrichs et al. 2012). Nuestros resultados indican que las alteraciones de los circuitos ocurren en una fase previa a esta acumulación, por lo que en la búsqueda de un posible mecanismo que pudiera explicar los hallazgos de los registros electrofisiológicos exploramos los niveles de fosforilación de la proteína tau en dos de los sitios que se fosforilan más tempranamente durante la EA (Mondragon-Rodriguez et. al 2010).

Mediante Western Blot analizamos la proteína tau fosforilada en los sitios S396 y Thr231 en el hipocampo en el modelo 3xTg-AD. Fue evidente un aumento de la fosforilación para ambos sitios (Fig. 9) en el animal 3xTg-AD respecto al Non-Tg en ambos sitios (para Thr231: n=4, para cada grupo, media del 3xTg-AD de 0.377 y del Non-Tg 0.1664, con un valor de α 0.05, diferencia significativas p=0.01, df=6, Mann-Whitney test); para S393: n=6, para cada grupo, media del 3xTg-AD de 0.6438 y del Non-Tg 0.3707, con un valor de α 0.05, diferencia significativas p=0.01, df=10, Mann-Whitney test).

Mediante inmunohistoquímica determinamos localización anatómica de este aumento en la fosforilación de la proteína; para el sitio S396 la distribución resulta casi homogénea en la capa piramidal de la región CA1 del hipocampo (Fig. 10A) de donde se obtuvieron los registros electrofisiológicos. La fosforilación de la proteína tau puede observarse en el soma de las neuronas piramidales y en la dendrita apical de las mismas (Fig. 10B), en contraste en la región de CA1 del animal Non-Tg donde es evidente la ausencia de este fenómeno (Fig. 10C).

La fosforilación de la proteína tau en el sitio S396 es significativamente mayor en todas las áreas del hipocampo en el animal 3xTg-AD (n=6, para ambos grupos, con media de inmunofluorescencia relativa en CA1 para Non-Tg de 505.673 y para el 3xTg-AD de 5967.28; en CA3 para el Non-Tg de 699.20 y 3xTg-AD de 4201.95, en subículum para Non-Tg de 455.88 y en el 3xTg-AD de 1538.96 y finalmente en

el giro dentado media del Non-Tg 311.33 y en el 3xTg-AD 288.99, α 0.05, con diferencia significativa en todas las áreas excepto giro dentado, $p = <0.001$, $df = 10$, Mann-Whitney test), además, la fosforilación fue significativamente mayor en la región de CA1 respecto al resto de las áreas del mismo sujeto 3xTg-AD (Fig. 10D), indicando que los cambios detectados, y la patología, tendría su inicio en ésta región.

Resultados similares fueron obtenidos para la proteína fosforilada en el sitio Thr231; igual que en el caso de la S396 se demostró un aumento significativo en la fosforilación en el tejido hipocampal de los animales 3xTg-AD (Fig. 11A) respecto a los Non-Tg. Nuevamente la distribución intracelular comprometió el soma y los procesos de las neuronas del sujeto 3xTg-AD (Fig. 11B), patrón que no se hace evidente en el hipocampo del Non-Tg (Fig. 11C).

De forma similar a la fosforilación en el sitio S396, cuantitativamente, los niveles de fosforilación de la proteína tau para el sitio Thr231 fueron significativamente mayores en el animal 3xTg-AD respecto al Non-Tg ($n=6$, para ambos grupos, con media de inmunofluorescencia relativa en CA1 para Non-Tg de 291.1 unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a) y para el 3xTg-AD de 3171 u.a; en CA3 para el Non-Tg de 699.20 u.a y 3xTg-AD de 3008 u.a y en el giro dentado media del Non-Tg 311.33 u.a y para el 3xTg-AD de 1741 u.a, α 0.05, con diferencia significativa en todas las áreas excepto giro dentado, $p = <0.001$, $df = 10$, Mann-Whitney test, 11D); y se corroboró, como en el caso anterior, que el aumento más significativo ocurre en la zona CA1 del hipocampo de estos animales.

Aunque ambos sitios mostraron hiperfosforilación en el ratón 3xTg-AD, de manera cuantitativa se encontraron diferencias en el grado de fosforilación siendo significativamente mayor para el caso del residuo S396 ($n=6$ para ambos grupos) un valor de α 0.05, diferencia significativa $p = <0.0001$, $df=4$, Mann-Whitney test, (Fig. 12).

Figura 9

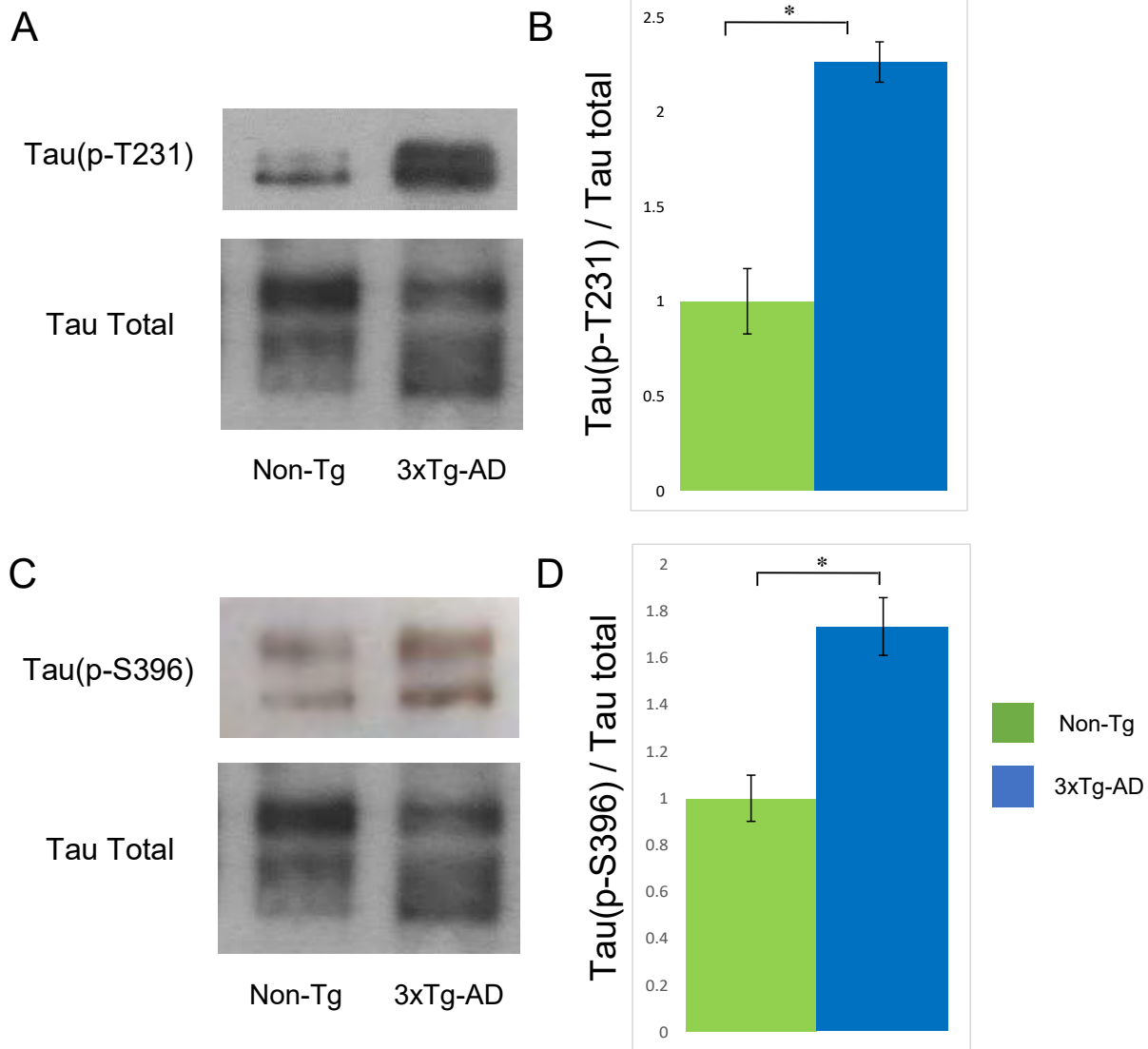


Figura 9. Cuantificación de la fosforilación de proteína tau. **A.** Western Blot para la proteína tau fosforilada en el residuo Thr231 y para proteína tau total en una muestra de ratón Non-Tg (izquierdo) y 3xTg-AD (derecho). **B.** Cuantificación del radio TauP-Thr231 y Tau total normalizado al Non-Tg ($n=4$, para cada grupo, media del 3xTg-AD de 0.377 y del Non-Tg 0.1664, con un valor de α 0.05, diferencia significativas $p=0.01$, $df=6$, Mann-Whitney test) **C.** Western Blot para la proteína tau fosforilada en el residuo S396 y para proteína tau total en una muestra de ratón Non-Tg (izquierdo) y 3xTg-AD (derecho). **D.** Cuantificación del radio TauP-S396 y Tau total normalizado al Non-Tg ($n=6$, para cada grupo, media del 3xTg-AD de 0.6438 y del Non-Tg 0.3707, con un valor de α 0.05, diferencia significativas $p=0.01$, $df=10$, Mann-Whitney test)

Figura 10

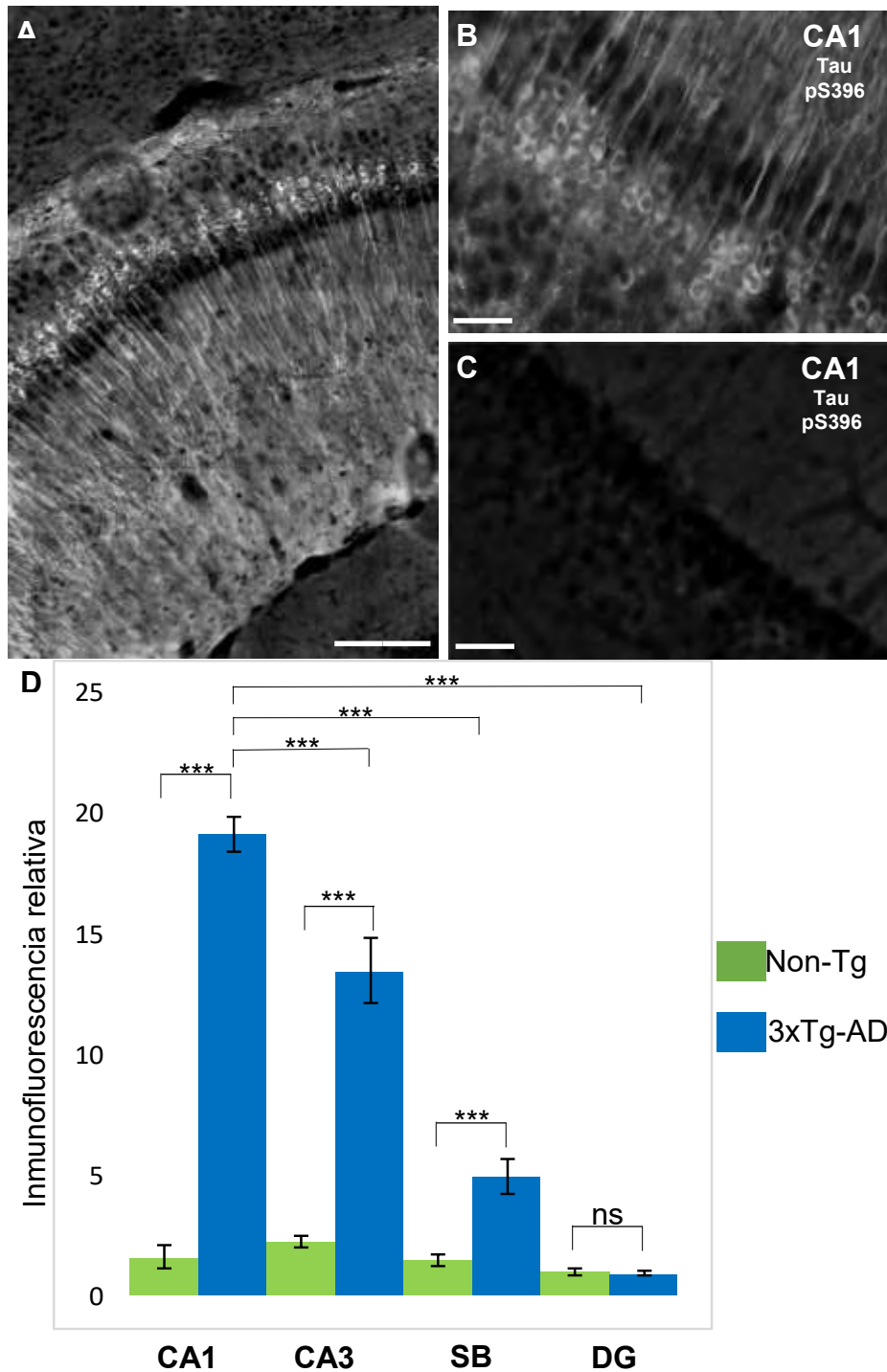


Figura 10. Fosforilación de la proteína tau en el sitio S396 en el modelo 3xTg-AD. *A.* Imagen representativa de la región de CA1 de un ratón 3xTg-AD con PHF-1 para sitio de fosforilación S396 (escala 100um). *B.* Región de CA1 de ratón 3xTg-AD para el mismo sitio (escala 50um). *C.* Región de CA1 de ratón Non-Tg para el mismo sitio de fosforilación. *D.* Cuantificación por regiones de fosforilación (inmunofluorescencia relativa) normalizado al Non-Tg (n=6 para ambos grupos)

Figura 11

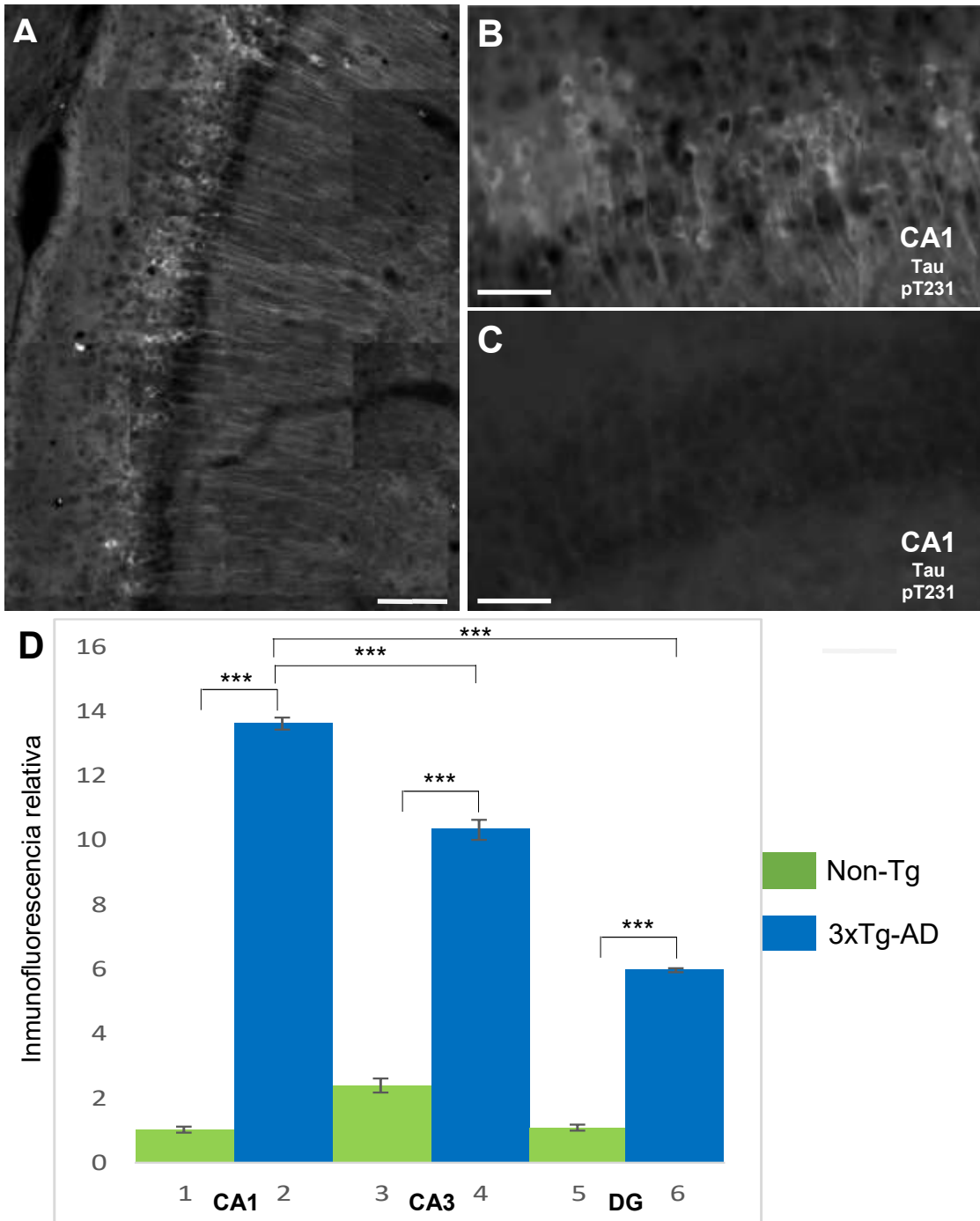


Figura 11. Fosforilación de la proteína tau en el sitio T231 en el modelo 3xTg-AD. A. Imagen representativa de la región de CA1 de un ratón 3xTg-AD con AT180 para sitio de fosforilación Thr231 (escala 100µm). **B.** Región de CA1 de ratón 3xTg-AD para el mismo sitio (escala 50µm). **C.** Región de CA1 de ratón Non-Tg para el mismo sitio de fosforilación. **D.** Cuantificación por regiones de fosforilación (inmunofluorescencia relativa) normalizado al Non-Tg (n=6 para ambos grupos)

Figura 12

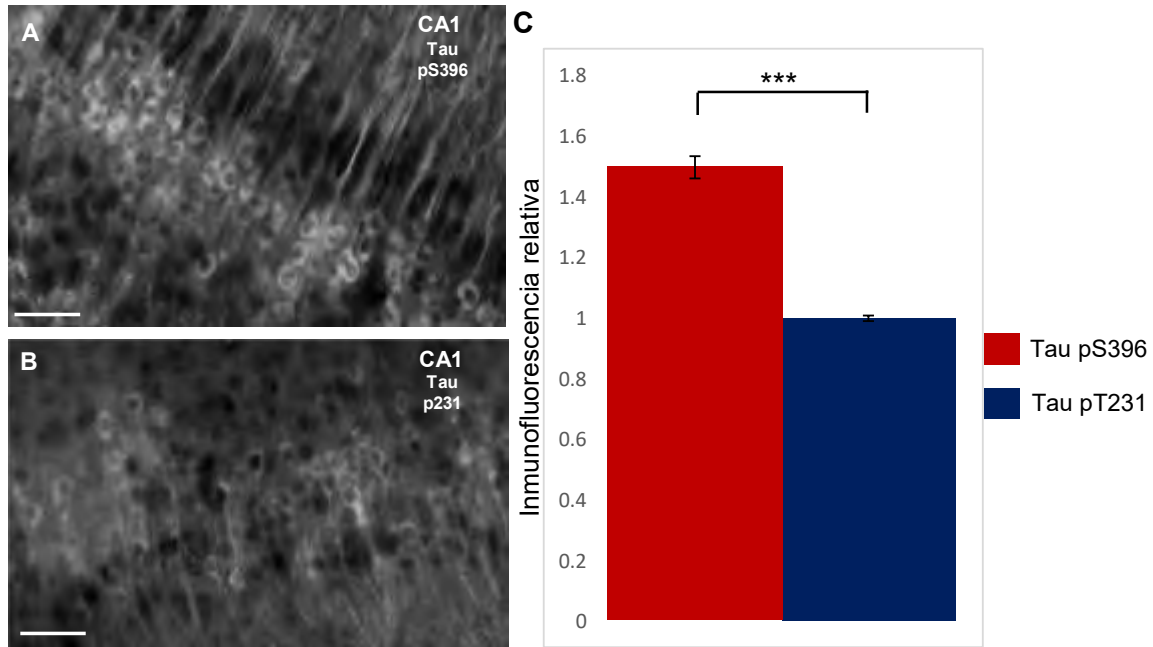


Figura 12. Comparación de fosforilación de la proteína tau en los sitios S396 y Thr231
A. Imagen representativa de la región de CA1 de un ratón 3xTg-AD con PHF-1 para sitio de fosforilación S396 (escala 50um). **B.** Imagen representativa de la región de CA1 de un ratón 3xTg-AD con AT180 para sitio de fosforilación Thr231 (escala 50um). **C.** Cuantificación de fosforilación (inmunofluorescencia relativa) normalizado al Thr231 (n=6 para ambos grupos) un valor de α 0.05, diferencias significativas $p = <0.0001$, $df=4$, Mann-Whitney test)

9.5 Exploración de cinasas responsables de la hiperfosforilación de la proteína tau en el modelo 3xTg-AD

La fosforilación de la proteína tau es un evento finamente regulado por cinasas y fosfatasa (Martin et al. 2013), el equilibrio entre la actividad de estos grupos de enzimas resulta crucial para la transmisión sináptica y la función neuronal (Martin et al. 2013) debido a que el ratón triple transgénico presentó una clara hiperfosforilación de la proteína tau en los sitios Thr231 y S396, a una edad a la que hasta el momento no se habían reportado cambios histopatológicos, decidimos explorar la actividad de una de las cinasas que más sitios de la proteína tau fosforila y que ha sido ampliamente estudiada por el papel que desempeña en la EA: la GSK3 β .

Usando la técnica de Western Blot se determinó la cantidad de GSK3 β fosforilada en el residuo S9, que conlleva la inactivación de la enzima, y a su vez la

cantidad de GSK3 β total en el ratón Non-Tg y 3xTg-AD (Fig.13A).

Se demostró una disminución en la fosforilación de GSK3 β en el ratón 3xTg-AD, lo que indica una mayor actividad de la cinasa, en comparación con el Non-Tg (n=7, para cada grupo, media del grupo Non-Tg de 0.4003 y del 3xTg-AD de 0.1343 con un valor de α 0.05, p=0.004, df=12, Mann-Whitney test (Fig. 13B).

Figura 13

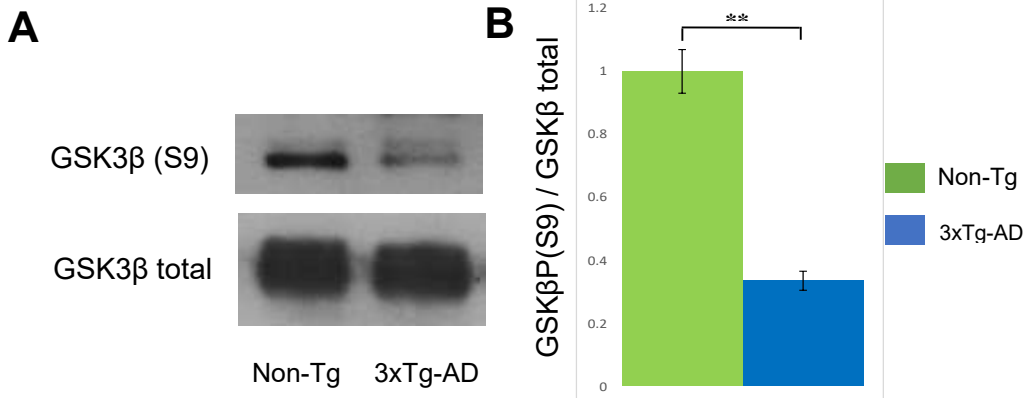


Figura 13. Actividad de la cinasa GSK3 β . **A.** Western Blot para GSK β fosforilada en el residuo S9 y GSK3 β total para una muestra de ratón Non-Tg (izquierdo) y transgénico (derecho). **B.** Cuantificación del radio relativo de GSK β (S9) y GSK β total (n=7, para cada grupo, media del 3xTg-AD de 0.4003 y del Non-Tg 0.1343, con un valor de α 0.05, con diferencia significativa p=0.004, df=12, Mann-Whitney test)

9. Discusión

En este proyecto se evaluaron las potenciales alteraciones a nivel de la actividad oscilatoria hipocampal espontánea en el ratón triple transgénico (3xTg-AD) que desarrolla los marcadores histopatológicos de la EA (placas formadas por proteína β A y MNFs formadas por proteína tau hiperfosforilada) a partir de los 6 meses de edad (Oddo et al. 2003). Nuestros resultados revelaron que existen alteraciones en los patrones de actividad cerebral en la banda theta a la edad de 30 días en el grupo de ratones 3xTg-AD cuando se comparó directamente contra el grupo Non-Tg (Fig. 7). Específicamente se evidenció un aumento a nivel de potencia en la actividad theta registrada en la capa piramidal del hipocampo (Fig. 7). Los resultados obtenidos son consistentes con los cambios electroencefalográficos que se reportan en estadios iniciales de la EA: un enlentecimiento gradual y difuso de la actividad eléctrica cerebral caracterizado por un aumento de potencia en las bandas theta y

delta seguido de una disminución en la potencia de alfa y beta (Gouw et al. 2017). Estas anomalías en el electroencefalograma (EEG) han sido confirmadas con el uso de magnetoencefalograma (Lopez et al. 2016) y se han encontrado en otras patologías, como la enfermedad de Parkinson (Klassen et al. 2011).

La actividad theta registrada en nuestro modelo transgénico se caracterizó por la presencia de eventos paroxísticos (Fig. 7J). Estos resultados junto con el aumento de potencia de la actividad theta sugieren cambios en la excitabilidad del circuito. Estudios electrofisiológicos en otros modelos animales de la EA proveen evidencia de que existen alteraciones en la plasticidad sináptica hipocampal, específicamente de la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) (Li et al. 2009), ambos fenómenos dependientes de la activación del receptor NMDA (Giese et al. 2009). En este sentido, en modelos de animales transgénicos que desarrollan la presencia de agregados de β A se ha detectado actividad eléctrica anómala que se caracteriza por estados de hiperexcitabilidad y actividad epileptiforme espontánea (Verret et al. 2012; Palop et al. 2016). Paralelamente, existen reportes que comprueban la presencia de convulsiones hipocampales silentes en pacientes con la EA en estadios tempranos (Lam et al. 2017) y numerosos estudios que demuestran la existencia de actividad epileptiforme en pacientes con deterioro cognitivo leve (Vossel et al. 2013; Cretin et al. 2016).

Para evaluar si nuestros resultados a nivel de actividad eléctrica se reflejaban a nivel conductual, sometimos a los grupos de animales a una tarea dependiente de hipocampo. Los resultados mostraron que en los animales 3xTg-AD no presentaron alteraciones conductuales a la edad de 30 días (Fig. 8). En este sentido, los cambios conductuales más tempranos en el animal 3xTg-AD han sido reportados a la edad de 4 meses (Oddo et al. 2003). Considerando nuestros resultados, puede establecerse que los hallazgos electrofisiológicos preceden a las alteraciones cognitivas, lo que insta a proponer a estas modificaciones tempranas en la actividad eléctrica como un sólido biomarcador en los procesos neurodegenerativos.

A pesar de que no existían alteraciones cognitivas en el modelo 3xTg-AD, los cambios en la actividad theta hipocampal sugerían cambios estructurales o funcionales en las neuronas que generan y mantienen este patrón oscilatorio: las

neuronas piramidales (Buzsaki et al. 2002). Para evaluar la integridad de estas células se estudiaron alteraciones en los niveles de fosforilación de la proteína tau, los animales 3xTg-AD mostraron un incremento en los niveles de fosforilación de la proteína tau en los sitios S396 y T231, que se limitaba casi exclusivamente a la capa piramidal del hipocampo; un cambio que hasta la fecha no había sido reportado en este modelo a edades tan tempranas.

Al mismo tiempo, la región del hipocampo que mayor grado de hiperfosforilación presentó para ambos sitios fue CA1, lugar de donde se realizó el registro electrofisiológico, lo que postula esta región como un punto de inicio de la patología en el ratón triple transgénico. De manera importante, se ha demostrado que los niveles de fosforilación de la proteína tau en los sitios cercanos a los dominios repetidos (T205, T231, S235, S396 y S404) regulan directamente la respuesta del receptor NMDA a través de su interacción con el complejo postsináptico PSD95-Fyn-NMDA (Mondragón-Rodríguez et al. 2012). Esta regulación resulta crucial para prevenir la potenciación de la respuesta sináptica promoviendo la depresión a largo plazo, lo que se postula como mecanismo de protección al circuito (Mondragón-Rodríguez et al. 2012).

De los dos sitios evaluados en nuestro proyecto, la fosforilación en el residuo S396 presenta un mayor incremento que el Thr231 lo que sugiere que la fosforilación de la proteína tau en el sitio S396 precede al de Thr231; estos resultados concuerdan con los hallazgos en tejido humano (Mondragón-Rodríguez et al. 2014) que postulan a este sitio como uno de los primeros en hiperfosforilarse durante el desarrollo de la EA (Mondragón-Rodríguez et al. 2014).

La fosforilación de proteína tau depende de un fino equilibrio entre la actividad de cinasas y fosfatasas, por lo que nuestros hallazgos sugerían la actividad aberrante de una o varias de estas enzimas. Tal es el caso de la cinasa GSK3 que fosforila residuos de serina y treonina en muchos sustratos, incluyendo la proteína tau (42 sitios) (Martin et al. 2013). Su isoforma β se expresa abundantemente en tejido cerebral y ha sido co-localizada con las MNF por lo que se especula, es una cinasa crítica para la hiperfosforilación de la proteína durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Giese et al. 2009). Apoyando estos reportes,

nuestros datos evidenciaron un aumento en la actividad de esta cinasa en los animales 3xTg-AD (Fig 13). De manera importante, existen estudios que relacionan los niveles de actividad de esta cinasa con la regulación de los fenómenos de plasticidad sináptica LTP y LTD (Peineau, T et al.2007). Particularmente se ha demostrado que el aumento en la actividad de esta cinasa es crucial para inducción de LTD, durante el LTD la activación de la proteína fosfatasa 1 (PP1) produce a la desfosforilación de la GSK3 β en el residuo S9, además inhibe la acción de la proteína quinasa B (Akt); ambas acciones generan un incremento en la actividad de GSK3 β necesaria para que el LTD ocurra. (Peineau 2007). Adicionalmente, se ha reportado que un incremento en los niveles de fosforilación de la proteína tau promueve la depresión sináptica (Mondragón-Rodríguez et al. 2012). En consecuencia, nuestros resultados sobre el incremento en los niveles de fosforilación de tau y actividad de GSK3 β sugieren que el circuito del ratón 3xTg-AD a los 30 días presenta activación de mecanismos de compensación homeostática destinados a proteger el circuito contra un estado de hiperexcitabilidad (Giese et. al 2009; Mondragón-Rodríguez et al. 2012).

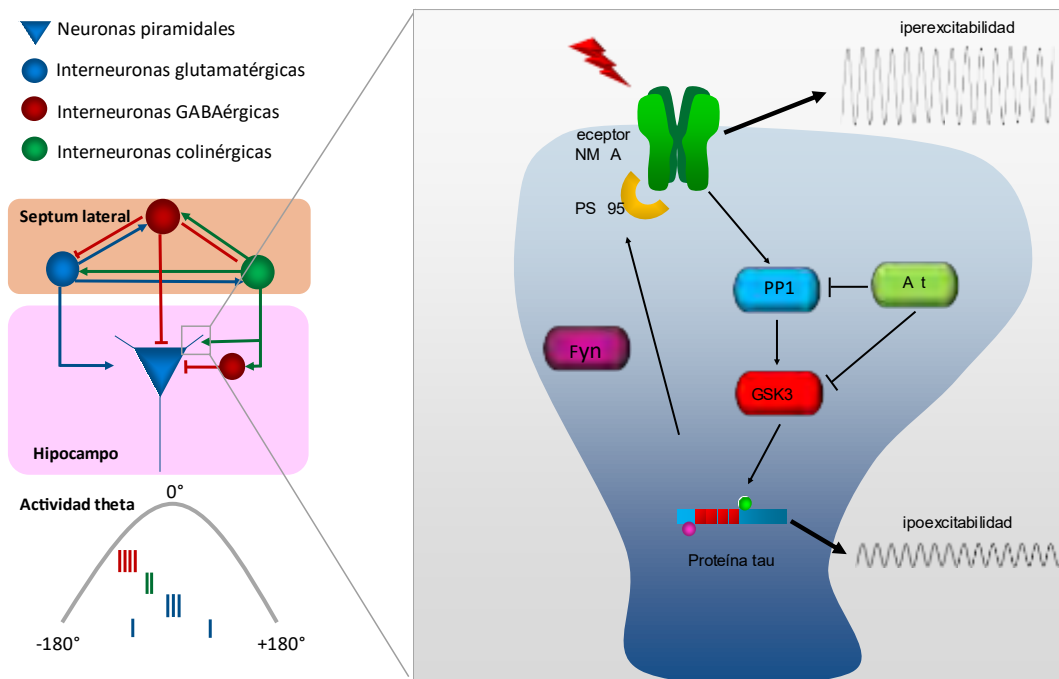
A nivel de mecanismo se ha propuesto que, la hiperfosforilación de la proteína tau, en sus sitios cercanos a los dominios repetidos, reduce su afinidad por PSD95 y evita el reclutamiento de la cinasa Fyn, crucial para la activación al receptor NMDA; esta cadena de eventos resulta decisiva para regular la disponibilidad del receptor en la membrana, induciendo LTP (Mondragón-Rodríguez et al. 2012). Así mismo, este fenómeno activa a la PP1 e inhibe Akt, lo que se traduce en un aumento de la actividad GSK3 β incrementado a su vez la fosforilación de la proteína tau (Fig. 14).

En resumen, los hallazgos de este estudio demuestran que en el ratón 3xTg-AD a la edad de 30 díasm hay alteraciones electrofisiológicas a nivel de potencia, así como eventos paroxísticos que sugieren que el circuito hipocampal pudiera encontrarse en un estado de hiperexcitabilidad; estos cambios preceden no solo al establecimiento de los marcadores histopatológicos sino también al deterioro cognitivo en el animal. Por lo que puede postularse a estas alteraciones en la

actividad theta como un biomarcador sensible para predecir el deterioro cognitivo en el proceso diagnóstico de trastornos neurodegenerativos como la EA.

10. Conclusiones

1. Existen alteraciones en los patrones de actividad cerebral en la banda theta a nivel de potencia que preceden a las alteraciones cognitivas en el modelo 3xTg-AD a los 30 días de edad.
2. Estas alteraciones correlacionan con un incremento en los niveles de fosforilación de la proteína tau en los sitios S396 y Thr231.
3. La proteína tau hiperfosforilada se localizó principalmente en las neuronas de la capa piramidal del hipocampo.
4. La actividad de GSK3 β está incrementada en ratón 3xTg-AD rompiendo con el equilibrio cinasas/fosfatasa que mantienen la fosforilación dinámica de la proteína tau.



11. Bibliografía

- Ahmad-Annur, A. (2003). "Mouse models as a tool for understanding neurodegenerative diseases." Curr Opin Neurol **16**(4): 451-458.
- Alekseichuk, I. (2016). "Spatial Working Memory in Humans Depends on Theta and High Gamma Synchronization in the Prefrontal Cortex." Curr Biol **26**(12): 1513-1521.
- Alzheimer's, A. (2014). "2014 Alzheimer's disease facts and figures." Alzheimers Dement **10**(2): e47-92.
- Andorfer, C. (2003). "Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms." J Neurochem **86**(3): 582-590.
- Arendt, T. (2016). "Tau and tauopathies." Brain Res Bull **126**(Pt 3): 238-292.
- Aronov, S. (2001). "Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal." J Neurosci **21**(17): 6577-6587.
- Ballatore, C. (2007). "Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders." Nat Rev Neurosci **8**(9): 663-672.
- Baruch-Suchodolsky, R. (2009). "A β 40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems." Biochemistry **48**(20): 4354-4370.
- Becker, J. T. (2002). "[The semantic memory deficit in Alzheimer's disease]." Rev Neurol **35**(8): 777-783.
- Benke, T. (1993). "Two forms of apraxia in Alzheimer's disease." Cortex **29**(4): 715-725.
- Binder, L. I. (2005). "Tau, tangles, and Alzheimer's disease." Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease **1739**(2-3): 216-223.
- Blennow, K. (2010). "Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease." Nat Rev Neurol **6**(3): 131-144.
- Bogoyevitch, M. A. (2004). "Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential." Biochim Biophys Acta **1697**(1-2): 89-101.
- Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes." Acta Neuropathol **82**(4): 239-259.
- Brown, E. E. (2016). "Amyloid deposition in semantic dementia: a positron emission tomography study." Int J Geriatr Psychiatry **31**(9): 1064-1074.

- Buzsaki, G. (2002). "Theta oscillations in the hippocampus." Neuron **33**(3): 325-340.
- Calhoun, M. E. (1998). "Neuron loss in APP transgenic mice." Nature **395**(6704): 755-756.
- Colell, A. (2009). "Mitochondria, cholesterol and amyloid beta peptide: a dangerous trio in Alzheimer disease." J Bioenerg Biomembr **41**(5): 417-423.
- Cretin, B. (2016). "Epileptic Prodromal Alzheimer's Disease, a Retrospective Study of 13 New Cases: Expanding the Spectrum of Alzheimer's Disease to an Epileptic Variant?" J Alzheimers Dis **52**(3): 1125-1133.
- Cuadra, G. (1995). "Effects of cholinesterase inhibitors and clonidine coadministration on rat cortex neurotransmitters in vivo." J Pharmacol Exp Ther **275**(1): 228-236.
- Czigler, B. (2008). "Quantitative EEG in early Alzheimer's disease patients - power spectrum and complexity features." Int J Psychophysiol **68**(1): 75-80.
- d'Abramo, C. (2015). "Passive Immunization in JNPL3 Transgenic Mice Using an Array of Phospho-Tau Specific Antibodies." PLoS One **10**(8): e0135774.
- D'Souza, I. (1999). "Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5598-5603.
- Dehvari, N. e. a. (2008). "Presenilin regulates extracellular regulated kinase (Erk) activity by a protein kinase C alpha dependent mechanism." Neurosci Lett **436**(1): 77-80.
- DeKosky, S. T. (1990). "Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity." Ann Neurol **27**(5): 457-464.
- Dickson, D. W. (1995). "Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly." Neurobiol Aging **16**(3): 285-298; discussion 298-304.
- Dorostkar, M. M. (2015). "Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities." Acta Neuropathol **130**(1): 1-19.
- Dubois, B. (2007). "Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria." Lancet Neurol **6**(8): 734-746.
- Duff, K. (1996). "Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1." Nature **383**(6602): 710-713.
- Eichenbaum, H. (2010). "An animal model of amnesia that uses Receiver Operating Characteristics (ROC) analysis to distinguish recollection from familiarity deficits in recognition memory." Neuropsychologia **48**(8): 2281-2289.

- Ekstrom, A. D. (2003). "Cellular networks underlying human spatial navigation." Nature **425**(6954): 184-188.
- Embi, N. e. a. (1980). "Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase." Eur J Biochem **107**(2): 519-527.
- Feijoo, C. e. a. (2005). "Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly." J Cell Sci **118**(Pt 2): 397-408.
- Ferri, C. P. (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." Lancet **366**(9503): 2112-2117.
- Gamblin, T. C. (2000). "In vitro polymerization of tau protein monitored by laser light scattering: method and application to the study of FTDP-17 mutants." Biochemistry **39**(20): 6136-6144.
- Games, D. (1995). "Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein." Nature **373**(6514): 523-527.
- Giese, K. P. (2009). "GSK-3: a key player in neurodegeneration and memory." IUBMB Life **61**(5): 516-521.
- Goedert, M. (1989). "Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain." EMBO J **8**(2): 393-399.
- Goedert, M. (1989). "Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease." Neuron **3**(4): 519-526.
- Goedert, M. (1990). "Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization." EMBO J **9**(13): 4225-4230.
- Goedert, M. (1996). "Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans." Nature **383**(6600): 550-553.
- Goedert, M. (2005). "Mutations causing neurodegenerative tauopathies." Biochim Biophys Acta **1739**(2-3): 240-250.
- Goedert, M. (2006). "A century of Alzheimer's disease." Science **314**(5800): 777-781.
- Goutagny, R. (2013). "Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before Abeta overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease." Eur J Neurosci **37**(12): 1896-1902.

- Gouw, A. A. e. a. (2017). "EEG spectral analysis as a putative early prognostic biomarker in nondemented, amyloid positive subjects." Neurobiol Aging **57**: 133-142.
- Hanger, D. P., B. H. Anderton, et al. (2009). "Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease." Trends Mol Med **15**(3): 112-119.
- Hemmings, H. C., Jr. (2005). "Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action." Trends Pharmacol Sci **26**(10): 503-510.
- Heneka, M. T. (2007). "Inflammatory processes in Alzheimer's disease." J Neuroimmunol **184**(1-2): 69-91.
- Hentschke, H. (2007). "Muscarinic blockade weakens interaction of gamma with theta rhythms in mouse hippocampus." Eur J Neurosci **26**(6): 1642-1656.
- Herrmann, C. S. (2005). "Human EEG gamma oscillations in neuropsychiatric disorders." Clin Neurophysiol **116**(12): 2719-2733.
- Hinrichs, M. H. (2012). "Tau protein diffuses along the microtubule lattice." J Biol Chem **287**(46): 38559-38568.
- Holcomb, L. (1998). "Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes." Nat Med **4**(1): 97-100.
- Honig, L. S. (2001). "Natural history of Alzheimer's disease." Aging (Milano) **13**(3): 171-182.
- Hooper, C. e. a. (2008). "The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease." J Neurochem **104**(6): 1433-1439.
- Hutton, M. (1998). "Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17." Nature **393**(6686): 702-705.
FTDP-17.
- Igbavboa, U. (2009). "Amyloid beta-protein stimulates trafficking of cholesterol and caveolin-1 from the plasma membrane to the Golgi complex in mouse primary astrocytes." Neuroscience **162**(2): 328-338.
- Ittner, L. M. (2010). "Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models." Cell **142**(3): 387-397.
- Jack, C. R., Jr. (1999). "Prediction of AD with MRI-based hippocampal volume in mild cognitive impairment." Neurology **52**(7): 1397-1403.

- Janus, C. (2000). "A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease." Nature **408**(6815): 979-982.
- Kazui, H. (2005). "Everyday memory impairment of patients with mild cognitive impairment." Dement Geriatr Cogn Disord **19**(5-6): 331-337.
- Kim, S., K. J. Choi, et al. (2016). "Fisetin stimulates autophagic degradation of phosphorylated tau via the activation of TFEB and Nrf2 transcription factors." Sci Rep **6**: 24933.
- Klassen, B. e. a. (2011). "Quantitative EEG as a predictive biomarker for Parkinson disease dementia." Neurology **77**(2): 118-124.
- Klausberger, T. (2003). "Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo." Nature **421**(6925): 844-848.
- Klunk, W. E. (2004). "Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B." Ann Neurol **55**(3): 306-319.
- Lam, A. D. (2017). "Silent hippocampal seizures and spikes identified by foramen ovale electrodes in Alzheimer's disease." Nat Med **23**(6): 678-680.
- Lambracht (2009). "DNA beta-amyloid(1-42) trimer immunization for Alzheimer disease in a wild-type mouse model." JAMA **302**(16): 1796-1802.
- Lanoiselee, H. M. (2017). "APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases." PLoS Med **14**(3): e1002270.
- LeBoeuf, A. C. (2008). "FTDP-17 mutations in Tau alter the regulation of microtubule dynamics: an "alternative core" model for normal and pathological Tau action." J Biol Chem **283**(52): 36406-36415.
- Lee, V. M. (2001). "Neurodegenerative tauopathies." Annu Rev Neurosci **24**: 1121-1159.
- Lei, M. e. a. (2016). "Soluble Abeta oligomers impair hippocampal LTP by disrupting glutamatergic/GABAergic balance." Neurobiol Dis **85**: 111-121.
- Li, L. M. (2009). "Abeta(31-35)-induced neuronal apoptosis is mediated by JNK-dependent extrinsic apoptosis pathway." Neurosci Bull **25**(6): 361-366.
- Li, S. (2009). "Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake." Neuron **62**(6): 788-801.
- Li, S. (2012). "Increases of theta-low gamma coupling in rat medial prefrontal cortex during working memory task." Brain Res Bull **89**(3-4): 115-123.

- Lopez, M. E. e. a. (2016). "Searching for Primary Predictors of Conversion from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease: A Multivariate Follow-Up Study." J Alzheimers Dis **52**(1): 133-143.
- Lucas, J. J. e. a. (2001). "Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice." EMBO J **20**(1-2): 27-39.
- Manseau, F. (2008). "The hippocamposeptal pathway generates rhythmic firing of GABAergic neurons in the medial septum and diagonal bands: an investigation using a complete septohippocampal preparation in vitro." J Neurosci **28**(15): 4096-4107.
- Martin, L. e. a. (2013). "Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease." Ageing Res Rev **12**(1): 289-309.
- Mendez, M. F. (2006). "The accurate diagnosis of early-onset dementia." Int J Psychiatry Med **36**(4): 401-412.
- Mesulam, M. M. (1999). "Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles." Neuron **24**(3): 521-529.
- Mondragón-Rodríguez, S. (2008). "Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease." Int J Exp Pathol **89**(2): 81-90.
- Mondragón-Rodríguez, S. (2010). "Causes versus effects: the increasing complexities of Alzheimer's disease pathogenesis." Expert Rev Neurother **10**(5): 683-691.
- Mondragón-Rodríguez, S. (2012). "Amyloid Beta and tau proteins as therapeutic targets for Alzheimer's disease treatment: rethinking the current strategy." Int J Alzheimers Dis **2012**: 630182.
- Mondragón-Rodríguez, S. (2012). "Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation." J Biol Chem **287**(38): 32040-32053.
- Mondragón-Rodríguez, 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**(2): 121-135.
- Mondragón-Rodríguez, S. (2016). "Brain Connectivity as Potential Biomarker for Alzheimer's Disease " Journal of Neurology and Neuroscience.
- Mondragón-Rodríguez, S. (2016). "The Use of Neuropathology in Alzheimer's disease " International Clinical Pathology Journal **2**.

- Mucke, L. and et al. (2000). "High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation." J Neurosci **20**(11): 4050-4058.
- Nacharaju, P. (1999). "Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations." FEBS Lett **447**(2-3): 195-199.
- Nelson, L. (2015). "Slowing the progression of Alzheimer's disease; what works?" Ageing Res Rev **23**(Pt B): 193-209.
- Oddo, S. (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." Neuron **39**(3): 409-421.
- Palop, J. J. (2009). "Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease." Arch Neurol **66**(4): 435-440.
- Palop, J. J. e. a. (2016). "Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease." Nat Rev Neurosci **17**(12): 777-792.
- Pei, J. J. e. a. (1997). "Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain." J Neuropathol Exp Neurol **56**(1): 70-78.
- Peineau, S. (2007). "LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta." Neuron **53**(5): 703-717.
- Pepcu, G. (2010). "Cholinesterase inhibitors and memory." Chem Biol Interact **187**(1-3): 403-408.
- Poorkaj, P. (1998). "Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia." Ann Neurol **43**(6): 815-825.
- Price, J. C. (2005). "Kinetic modeling of amyloid binding in humans using PET imaging and Pittsburgh Compound-B." J Cereb Blood Flow Metab **25**(11): 1528-1547.
- Prince, M. (2012). "Dementia incidence and mortality in middle-income countries, and associations with indicators of cognitive reserve: a 10/66 Dementia Research Group population-based cohort study." Lancet **380**(9836): 50-58.
- Prince M, P. M., Guerchet M.. (2013). " World Alzheimer Report 2013: Journey of Caring. An analysis of long-term care for dementia." Alzheimer's i sease International. London, UK:.
- Puelles, L. M., S. Martínez. M. (2008). Neuroanatomy. Buenos Aires, Argentina.
- Rayasam, G. V. e. a. (2009). "Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake." Br J Pharmacol **156**(6): 885-898.

- Robinson, J. (2016). "Optogenetic Activation of Septal Glutamatergic Neurons Drive Hippocampal Theta Rhythms." J Neurosci **36**(10): 3016-3023.
- Romberg, C. (2011). "Impaired attention in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease: rescue by donepezil (Aricept)." J Neurosci **31**(9): 3500-3507.
- Rongve, A. (2013). "[Alzheimer's disease and genetics]." Tidsskr Nor Laegeforen **133**(14): 1449-1452.
- Rylatt, D. B. e. a. (1980). "Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase." Eur J Biochem **107**(2): 529-537.
- Scarmeas, N. (2007). "Disruptive behavior as a predictor in Alzheimer disease." Arch Neurol **64**(12): 1755-1761.
- Sergeant, N. e. a. (2008). "Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders." Expert Rev Proteomics **5**(2): 207-224.
- Shelat, P. B. (2008). "Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons." J Neurochem **106**(1): 45-55.
- Shen, C., Y. Chen, et al. (2008). "Hydrogen peroxide promotes Abeta production through JNK-dependent activation of gamma-secretase." J Biol Chem **283**(25): 17721-17730.
- Shipton, O. A., J. R. Leitz, et al. (2011). "Tau protein is required for amyloid {beta}-induced impairment of hippocampal long-term potentiation." J Neurosci **31**(5): 1688-1692.
- Spillantini, M. G. (2000). "Tau gene mutations in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17)." Neurogenetics **2**(4): 193-205.
- Squire, L. R. (2017). "Memory for relations in the short term and the long term after medial temporal lobe damage." Hippocampus **27**(5): 608-612.
- Stanford, P. M. (2003). "Mutations in the tau gene that cause an increase in three repeat tau and frontotemporal dementia." Brain **126**(Pt 4): 814-826.
- Strange, B. A. (2014). "Functional organization of the hippocampal longitudinal axis." Nat Rev Neurosci **15**(10): 655-669.
- Sturchler-Pierrat, C. (1997). "Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13287-13292.

- Sun, W. (2016). "Attenuation of synaptic toxicity and MARK4/PAR1-mediated Tau phosphorylation by methylene blue for Alzheimer's disease treatment." Sci Rep **6**: 34784.
- Swanson, L. W. (1979). "The connections of the septal region in the rat." J Comp Neurol **186**(4): 621-655.
- Sweeney, M. D. (2015). "Cerebrospinal fluid biomarkers of neurovascular dysfunction in mild dementia and Alzheimer's disease." J Cereb Blood Flow Metab **35**(7): 1055-1068.
- Takashima, A. (2001). "[Analysis of mouse model exhibiting neurofibrillary changes]." Rinsho Shinkeigaku **41**(12): 1111-1112.
- Tanemura, K. (2001). "Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau." Neurobiol Dis **8**(6): 1036-1045.
- Terry, R. D. (1991). "Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment." Ann Neurol **30**(4): 572-580.
- Thornton, T. M. e. a. (2008). "Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation." Science **320**(5876): 667-670.
- Utton, M. A. (2005). "Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein." J Cell Sci **118**(Pt 20): 4645-4654.
- van Deursen, J. A. (2008). "Increased EEG gamma band activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." J Neural Transm (Vienna) **115**(9): 1301-1311.
- Vanderwolf, C. H. (1988). "Cerebral activity and behavior: control by central cholinergic and serotonergic systems." Int Rev Neurobiol **30**: 225-340.
- Vemuri, P. (2009). "MRI and CSF biomarkers in normal, MCI, and AD subjects: predicting future clinical change." Neurology **73**(4): 294-301.
- Verret, L. e. a. (2012). "Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model." Cell **149**(3): 708-721.
- Vertes, R. P. (2004). "Theta rhythm of the hippocampus: subcortical control and functional significance." Behav Cogn Neurosci Rev **3**(3): 173-200.
- Vossel, K. A. (2013). "Seizures and epileptiform activity in the early stages of Alzheimer disease." JAMA Neurol **70**(9): 1158-1166.
- Waldemar, G. (2007). "Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline." Eur J Neurol **14**(1): e1-26.

- Walsh, D. M. (2004). "Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease." Neuron **44**(1): 181-193.
- Weingarten, M. D. (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(5): 1858-1862.
- Welsh, G. I. e. a. (1993). "Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B." Biochem J **294** (Pt 3): 625-629.
- Witman, G. B. (1976). "Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(11): 4070-4074.
- Wolfe (2009). "Tau mutations in neurodegenerative diseases." J Biol Chem **284**(10): 6021-6025.
- Woodgett, J. R. e., al. (1990). "Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A." EMBO J **9**(8): 2431-2438.
- Yamada, K. (2009). "Abeta immunotherapy: intracerebral sequestration of Abeta by an anti-Abeta monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble Abeta." J Neurosci **29**(36): 11393-11398.
- Yamaguchi, H. e. a. (1996). "Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II." Acta Neuropathol **92**(3): 232-241.
- Yanamandra, K. (2015). "Anti-tau antibody reduces insoluble tau and decreases brain atrophy." Ann Clin Transl Neurol **2**(3): 278-288.
- Yao, Z. X. (2002). "Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity." FASEB J **16**(12): 1677-1679.
- Zhang, B. (2004). "Retarded axonal transport of R406W mutant tau in transgenic mice with a neurodegenerative tauopathy." J Neurosci **24**(19): 4657-4667.
- Zhao, X. (2016). "Caspase-2 cleavage of tau reversibly impairs memory." Nat Med.
- Zhu, X., C. A. Rotkamp, et al. (2000). "Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **59**(10): 880-888.

12. Anexos

Phosphorylation of tau protein correlates with changes in hippocampal theta oscillations and reduces hippocampal excitability in Alzheimer's model

Siddhartha Mondragón-Rodríguez^{1,2*}, Anahí Salas-Gallardo², Perla González-Pereyra², Martín Macías², Benito Ordaz², Fernando Peña-Ortega², Azucena Aguilar-Vázquez², Erika Orta-Salazar², Sofia Díaz-Cintra², George Perry³ and Sylvain Williams⁴.

From the ¹CONACYT National Council for Science and Technology, México, México; ²UNAM Developmental Neurobiology and Neurophysiology, Institute of Neurobiology, National Autonomous University of México, Querétaro, México; ³UTSA Neuroscience Institute and Department of Biology, College of Sciences, University of Texas at San Antonio, San Antonio, Texas, USA and ⁴Department of Psychiatry, Douglas Mental Health University Institute, McGill University, Quebec, Canada.

Running title: Tau phosphorylation correlates with reduced excitability

*Leading and corresponding author: Siddhartha Mondragón-Rodríguez: Developmental Neurobiology and Neurophysiology, UNAM, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla, 76230 Santiago de Querétaro, Qro, México. sidmonrod@gmail.com, Tel : (442) 238 1057

Keywords: Tau, hyperphosphorylation, theta activity, epileptiform activity, receptor overexcitation, and compensatory mechanism

The abbreviations used are: AD, Alzheimer's disease; MDr, microtubule domain region; 4-AP, 4-aminopyridine; LTD, long-term depression

ABSTRACT

Tau hyperphosphorylation at several sites, including those close to the microtubule domain region (MDr), is considered a key pathological event in the development of Alzheimer's disease (AD). Recent studies indicate that at the very early stage of this disease, increased phosphorylation in tau's MDr domain correlates with reduced levels of neuronal excitability. Mechanistically, we show that pyramidal neurons and some parvalbumin-positive interneurons in 1-month-old triple transgenic AD mice accumulate hyperphosphorylated tau protein and that this accumulation correlates with changes in theta oscillations in hippocampal neurons. Pyramidal neurons from young-triple transgenic AD mice exhibited less spike accommodation and power increase in subthreshold membrane oscillations. Furthermore, triple-transgenic AD mice challenged with the potassium channel

blocker 4-aminopyridine had reduced theta amplitude compared with 4-aminopyridine-treated control mice and unlike these controls, displayed no seizure-like activity after this challenge. Collectively, our results provide new insights into AD pathogenesis and suggest that increases in tau phosphorylation at the very initial stages of the disease represent neuronal responses that compensate for brain circuit overexcitation.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is characterized by cognitive deficits that are correlated with aberrant hippocampal activity^{1,2}. The hippocampus, which plays a critical role in learning and memory, is dramatically affected by the extracellular amyloid- β (A β) plaques and intracellular tau neurofibrillary tangles mainly comprised of hyperphosphorylated tau protein³. Due to this neuropathological correlation, the two lesions have been proposed as the main

culprit of AD^{4,6}. However, a new hypothesis that has emerged in recent years implicates brain activity alterations that lead to hippocampal memory loss and precede classical AD lesions^{2,7}. The brain activity alterations would be enough to impair hippocampal synaptic plasticity, which translates into memory deficit^{2,8}. Although the mechanism responsible for these early pathological changes remains elusive, soluble fragments of A β and hyperphosphorylated tau protein have been suggested to trigger them^{2,9}. For instance, impaired hippocampal activity can be induced by dendritic missorting of hyperphosphorylated tau protein⁹, whereas A β oligomers can induce tau phosphorylation at pathological sites such as S199, Th217, Th231, S235, S396, S404 and S422¹⁰, which are located close to the microtubule domain region (MDr) of tau protein¹¹. However, we have shown that A β -induced tau phosphorylation at Th231, S235, S396 and S404 down-regulates N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) function, promoting the induction of long-term depression (LTD), a type of synaptic plasticity critical for learning¹¹. Our data suggest that phosphorylation of tau MDr sites could modulate synaptic transmission, plasticity, oscillatory activity and thus preventing A β -induced NMDA-mediated overexcitation^{11,12}. Accordingly, increased tau phosphorylation at pathological site S205 was found to decrease the susceptibility to A β excitotoxicity¹³. Moreover, studies have reported very early accumulation of abnormally phosphorylated tau at site Th231 in the parvalbumin positive (PARV+) hippocampal interneurons, which could contribute to changes in hippocampal activity¹⁴.

Here, we used a young triple transgenic AD (3xTg-AD) mouse model (one month old)¹⁵ and tested whether very early phosphorylation of tau MDr sites could correlate with changes in hippocampal activity and lower predisposition to hyperexcitability. The 3xTg-AD mice harbor mutated human (amyloid precursor protein, APP), tau and PS1 genes and exhibit

cognitive impairments related to A β and tau pathology as early as fourth months of age¹⁵. To determine potential changes in the hippocampal circuit of the young 3xTg-AD model we measured the level of excitability and oscillatory activity (proposed to be involved in memory storage and information processing¹⁶) by recording the intrinsic spontaneously generated CA1/subiculum theta oscillations.

Our data revealed that in the young 3xTg-AD model, tau directly accumulates in pyramidal neurons and in some PARV+ hippocampal interneurons. Importantly, the hippocampus is known for generating theta activity due to coordinated synchronous activity of multiple neuronal assemblies, including PARV+ and pyramidal cells¹⁷. Moreover, our findings showed that the detected changes in brain activity precede cognitive deficits. Finally, our data indicated that the increase in tau phosphorylation at tau MDr sites correlates with lower predisposition to 4-aminopyridine (4-AP) overexcitation of the hippocampal circuitry.

RESULTS

Tau phosphorylation increases in 3xTg-AD mice-To explore the possibility that MDr tau phosphorylation increases at very early stages, we measured the levels of tau phosphorylation in the young p30 mice (Fig. 1A). Western blot analysis of total protein revealed an increase in phosphorylated tau at the S396 site in the 3xTg-AD mice when compared to the family related Non-Tg group (Fig. 1B). Statistical analysis further confirmed our findings, as a significant 3.18 \pm 0.32-fold increase was found in the levels of phosphorylated tau at the S396 site in the 3xTg-AD mice when compared to Non-Tg mice (Fig. 1C). The presence of phosphorylated tau protein in Non-Tg mice was barely detected (data not shown). Notably, phosphorylated tau protein was found coexisting along the entire pyramidal population in the young 3xTg-AD mice (Fig. 1D). The presence of phosphorylated tau was clearly observed coexisting with the pyramidal cell layer of CA1 (Fig. 1E).

Importantly, pyramidal neurons are responsible for generating synchronous neuronal activity including theta rhythms¹⁸. Although the subiculum showed the less number of pyramidal cells coexisting with S396, no significant differences were detected when compared to the CA1 or CA3 regions (Fig. 1F, insert). Taken together, and consistent with our previous findings¹⁹, our data showed that sites located at the tau carboxy-terminal domain increase at initial stages of disease progression. Thus, phosphorylated tau preferentially coexists with the pyramidal cell layer of the entire hippocampus of the young 3xTg-AD mice model.

Tau phosphorylation increases in N-terminus tau sites-To further study tau phosphorylation sites close to their MDR, we evaluated the levels of tau phosphorylation at sites Th231-S235 labelled by monoclonal antibody AT180 (Fig. 2A). In agreement with our previous data, the presence of phosphorylated tau protein at sites Th231 and S235 was found coexisting along the entire pyramidal population in the young p30 3xTg-AD mice (Fig. 2A). The increase of phosphorylation levels at sites Th231-S235 is clearly observed in the pyramidal cell from the hippocampus (Fig. 2B). The presence of phosphorylated N-terminus tau sites in Non-Tg mice was barely detected (data not shown). Importantly, some PARV+ hippocampal interneurons in p30 3xTg-AD mice (Fig. 2C) accumulate phosphorylated forms of tau (Fig. 2D, see merge in 2E). A more detailed analysis of AT-180 positive PARV+ cells in p30 3xTg-AD mice (Fig. 2F) revealed a diffuse phospho-tau positive staining within the cytoplasm, sometimes comprising small punctate regions (Fig. 2G, see merge in 2H). Surprisingly, entorhinal neurons express lower levels of phosphorylated tau when compared to hippocampal pyramidal neurons (Fig. 2I).

Network oscillatory activity at theta band frequency is altered in young 3xTg-AD mice-The network oscillatory activity can be evaluated by performing extracellular

recordings in the complete *in-vitro* septo-hippocampal preparation^{17,20}. We first studied the main properties of endogenous hippocampal oscillations in the middle CA1/subiculum area of the 3xTg-AD mice when compared to family-related Non-Tg mice. Importantly, our recordings were performed at thirty days of postnatal age (p30) in all groups (see Methods). In line with our previous findings^{21,22}, oscillatory activity from the Non-Tg group showed rhythmic theta activity (3-8 Hz) in the CA1 and subiculum areas, characterized by stable power and frequency (Fig. 3A, see magnification in 3B). Filtered traces at theta band frequency further confirmed the presence of rhythmic hippocampal theta activity (Fig. 3C). In contrast, hippocampal activity recorded from 3xTg-AD mice displayed altered theta rhythmicity (Fig. 3D, see magnification in 3E and filtered traces in 3F). The spectrogram analysis showed a regular power band at theta frequency in the Non-Tg mice (Fig. 3G). In contrast, the 3xTg-AD mice showed an irregular theta pick power band (Fig. 3H). Statistical analysis further confirmed rhythmic alterations in the middle CA1/subiculum area of 3xTg-AD mice (Fig. 3I). The average strength of theta oscillations recorded from the Non-Tg group was significantly higher than that of the 3xTg-AD group (Non-Tg: 0.034 ± 0.02 and 3xAD-Tg: 0.002 ± 0.0004 , Fig. 3I). Theta peak frequency analysis further confirmed an increase in the theta frequency band in 3xTg-AD mice when directly compared to Non-Tg mice (Fig. 3J). The average frequency of theta oscillations from the Non-Tg and 3xTg-AD groups was 2.76 ± 0.36 Hz and 4.51 ± 0.91 Hz, respectively (Fig. 3J). Statistical analysis also confirmed a significant increase in hippocampal theta frequency activity in the 3xTg-AD mice when compared to the Non-Tg mice (Fig. 3J). To summarize, our study revealed rhythmic alterations at the theta frequency band in the CA1/subiculum of young 3xTg-AD mice when directly compared to family-related Non-Tg mice (Fig. 3K).

To determine whether intrinsic properties of pyramidal cells are altered in 3xTg-AD mice, we performed patch-clamp recordings (Fig. 3L). Action potential properties were examined using current steps of increasing amplitude (see Methods). Although the amplitude and frequency of action potentials across different stimulus intensities did not differ between 3xTg-AD and Non-Tg group, significant power increase in subthreshold membrane oscillations was observed in the 3xTg-AD group (Fig. 3M and Table 1). In accordance, pyramidal cells from 3xTg-AD mice showed less spike accommodation (Non-Tg: 9.48 ± 1.93 and 3xAD-Tg: 2.22 ± 0.45 , Fig. 3N and Table 1).

Early brain circuit changes were independent of hippocampus-dependent behavioral task-To address the hippocampal function in our young 3xTg-AD group, we performed the burrowing and nesting tests^{23,24} (see Methods). Importantly, cytotoxic lesions in the hippocampus directly translate into significant reductions in the burrowing test²⁵. In contrast, medial prefrontal cortex lesions only induce a smaller reduction in the burrowing test²⁶. Thus, the burrowing test can be applied at early postnatal developmental ages²⁷. In the same vein, nesting is another assay that can be used to screen hippocampal-dependent behavioral alterations in young mice²⁴. In the burrowing test, the amount of displaced food pellets was measured after 2 and 12 h (Fig. 4A and 4B). The amount of food pellets removed from the burrow by animals belonging to the p30 3xTg-AD group was not significantly different from the number removed by animals belonging to the Non-Tg group at either 2 h (Fig. 4A) or 12 h (Fig. 4B). To further evaluate hippocampal-dependent behavior of 3xTg-AD mice, we performed the nesting assay (Fig. 4C). Consistent with our burrowing findings, we did not find significant differences between Non-Tg and 3xTg-AD mice in the nesting scores (Fig. 4C). In sum, the 3xTg-AD mice displayed no signs of hippocampal function

deficits at the early postnatal developmental age of p30.

Hippocampal network hyperexcitability was reduced in the 3xTg-AD mice-We recently reported that hippocampal network excitability is increased in the TgCRND8 AD mice²². This mice is characterized by A β deposition at 20 weeks of age⁶. Interestingly, in contrast to Non-Tg mice, blocking of Kv potassium channels with 4-AP in TgCRND8 at postnatal developmental stages (p30), increased theta power and induced seizure activity²². To examine the network excitability of 3xTg-AD mice in the same experimental conditions, we bath-applied 4-AP while recording the complete septo-hippocampal preparation obtained from Non-Tg and 3xTg-AD mice. Treatment with 4-AP elicited an increase in theta amplitude in the Non-Tg group (Fig. 5A, black square), which was followed by seizure-like activity (Fig. 5A, see magnification in the lower panel), characterized by ictal discharges²⁸. Conversely, 4-AP treatment in 3xTg-AD mice did not elicit a visible increase in theta amplitude (Fig. 5B). Contrary to the Non-Tg group, 4-AP treatment caused a reduction in theta amplitude, and no seizure-like activity was observed (Fig. 5B). Further supporting our findings, zero Mg²⁺ did not elicit detectable changes in the amplitude and frequency of theta activity in the 3xTgAD mice (Fig. 5C).

Statistical analysis further confirmed our findings, as a significant increase in theta magnitude was found during and after 4-AP stimulation in the Non-Tg group (3.53 ± 0.90 -fold increase when compared to baseline) (Fig. 5D). No significant changes were detected in frequency during the 4-AP treatment (Fig. 5E). Concomitantly, a significant decrease (0.64 ± 0.09 -fold decrease when compared to baseline) was detected in the 3xTg-AD group during and after 4-AP stimulation (Fig. 5F). Once again, no notable change was detected in the frequency of theta activity during and after 4-AP treatment in the 3xTg-AD group (Fig. 5G). Overall, the young 3xTg-AD mice

were characterized by a less excitable hippocampal network activity.

DISCUSSION

In this study, we assessed the structural and functional changes to pyramidal neurons from 3xTg-AD mice at the very early stage of disease progression (p30). Interestingly, we found that most of the pyramidal neurons in the CA1-3, subiculum regions, and in some PARV+ hippocampal interneurons from the one-month-old 3xTg-AD group, increased the levels of phosphorylated tau protein at MDr sites (Fig. 1 and 2).

Since pyramidal cells and PARV+ interneurons are mainly responsible for the generation and maintenance of theta rhythms¹⁸, our data suggested the existence of very early changes in hippocampal oscillatory activity which could affect cognitive function. Importantly, it has been proposed that low-frequency neural entrainment in the neural theta bands provides a mechanism to represent and integrate temporal information²⁹⁻³¹.

To isolate the correlation of hyperphosphorylated tau protein in hippocampal circuit activity, we recorded the spontaneously generated theta activity in the pyramidal cell layer of the 3xTg-AD model. Our data revealed that spontaneously generated theta oscillations are altered as early as 30 days of age in the 3xTg-AD group (Fig. 3). Specifically, we found a significant reduction in rhythmicity and a significant increase in theta frequency (Fig. 3). Further supporting our findings, pyramidal cells from 3xTg-AD mice had significant power increase of subthreshold membrane oscillations and reduction of the spike accommodation (Fig. 3 and Table 1).

Similarly, changes in hippocampal theta activity have been correlated with the cognitive deficit observed during neurodegeneration³². Specifically, slowing of hippocampal activity has been correlated with cognitive decline in early onset AD³³. Considering this, the increase in theta frequency in our study argues against the decline of hippocampal-dependent

behavioral tasks. Aiming to explore this possibility, we performed the nesting and burrowing tests in the young 3xTg-AD model. Accordingly, our one-month-old 3xTg-AD group did not show hippocampal-dependent behavioral abnormalities (Fig. 4). In the 3xTg-AD model, alterations in hippocampal-dependent tasks are detected as early as fourth months of age³⁴, hence supporting our findings. Altogether, our work provides evidence that the electrophysiological changes precede memory impairment in the 3xTg-AD model. Thus, our data postulates, very early alterations in theta activity as a potential biomarker that precedes any detected cognitive deficit observed during neurodegeneration. To further support our conclusions, the hypothesis that alterations in network activity, specifically hypersynchronous network activity preceding protein deposition and cognitive dysfunction in AD models, has been widely recognized³⁵⁻³⁷.

Although there was no evidence of cognitive deficit in the p30 3xTg-AD model, abnormal excitability in the CA3 hippocampal network was recently reported³⁸. To study the level of the hippocampal circuit excitability in the CA1/subiculum pyramidal cell layer of the young 3xTg-AD model, we bath-applied 4-AP while recording theta activity (Fig. 5). Blocking of Kv potassium channels with 4-AP, in TgCRND8 at early p30, increased theta power and induced seizure activity²². Altogether, our data demonstrated for the first time that the CA1 hippocampal network in the TgCRND8 AD mouse model showed hyperexcitability preceding protein deposition and cognitive impairments²². However, the blocking of Kv channels in the p30 3xTg-AD mouse model exerted the opposite effect; the CA1/subiculum hippocampal network showed significantly reduced excitability when compared to the Non-Tg group (Fig. 5). In addition, seizure susceptibility in young 3xTg-AD mice was significantly diminished (Fig. 5). Of relevance, whole-cell 4-AP-sensitive K+ current amplitude did not change from one-

month old to six-month old and was not different in 3xTg-AD mice compared with in WT in CA1, CA3 or dentate neurons³⁹. Altogether, these findings suggest the activation of homeostatic mechanisms that aim to protect the hippocampal network excitability levels. As previously mentioned, we reported that tau phosphorylation at MDr sites could serve as a regulatory mechanism to prevent overexcitation¹¹. Specifically, we reported that increases in sites Th231, S235, S396 and S404 reduced susceptibility to excitotoxicity by perturbing the PSD-95/Tau/Fyn synaptic complex, therefore promoting the synaptic response to depression rather than to potentiation¹¹. Recently, it has been reported that increased tau phosphorylation inhibits amyloid- β toxicity and prevents seizure activity in AD transgenic mice, thus supporting our hypothesis¹³.

Importantly, our results do not rule out the possibility that the accumulated increase of hyperphosphorylated tau exerts deleterious effect on neural system function at later stages in the disease. However, our data showed that while the increase in phosphorylated tau at very early stages has no effect on hippocampal-dependent tasks, it could protect the hippocampal circuit from overexcitation.

Overall, our findings demonstrated that induced seizure activity decreases in young 3xTg-AD mice and, an increase in tau phosphorylation at MDr sites could mitigate hyperexcitability by directly interacting with the pyramidal circuitry that spontaneously generates theta oscillations. These findings are in line with our previous findings where we proposed that tau phosphorylation at MDr sites could serve as a regulatory mechanism that prevents NMDA receptor overexcitation produced by A β ¹¹. Also, the data presented in this document include additional importance since contradicted the current and leading hypothesis that postulates tau protein phosphorylation as mainly a pathological response. Instead, the data presented in this document, along with our previous data^{11,19}, showed that tau phosphorylation at initial stages of disease

progression could represent a compensatory mechanism that mediates neuroprotection against hyperexcitability. Finally, further studies on AD and other tauopathies are needed to fully understand the biological roles and post-translational modifications of tau protein¹².

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals-Male 30-35 days old 3xTg-AD and age-matched non-transgenic (Non-Tg) mice from strain B6129SF2/J (Jackson Labs.) were housed in groups of 2-4 animals and maintained on a 12:12 light cycle with water and food available *ad libitum*. Experimental procedures were approved by the Bioethics committee of the Institute of Neurobiology, UNAM. Genotype was confirmed by PCR (Jackson Labs. protocol). Mice were taken from their home cage and sacrificed by decapitation.

Electrophysiology-3xTg-AD and Non-Tg mice (aged 30-35 days) were decapitated, and the brain was rapidly removed and placed in ice-cold high sucrose artificial CSF (ACSF) solution (in mM: 252 sucrose, 3KCl, 2MgSO₄ 24 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 1.2 CaCl₂, and 10 glucose) and bubbled with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). A glass plate (inverted petri dish) covered with lens paper was used as the stage for most of the dissection. The glass plate can be rotated on the crushed ice throughout the dissection to gain access to various parts of the hippocampus with the dissection instruments. The cerebellum and frontal cortex were removed with a razor blade, and the hemispheres were separated and allowed to recover for 2-3 min in the oxygenated sucrose solution. Complete septo-hippocampal isolate was then removed from the remaining hemisection as described previously¹⁷. In sum, one spatula supported the inner portion of the cortical hemisphere, and the other was used to gently pull away the brainstem and thalamus to expose the hippocampal artery and underlying CA3 and dentate gyrus (DG). To separate the hippocampus from the cortex the spatula

was again placed between the cortex and extreme dorsal end of the hippocampus and moved smoothly through to the caudal portion of cortex. During this process the spatula helped separate the CA1/subicular tissue from the overlying cortex. The hippocampal complex was removed from the surrounding brain tissue by placing one spatula on the CA3/DG region of the dorsal hippocampus and pulling the dorsal hippocampus toward to the caudal portion of the brain. Blood vessels may impede prompt removal and should be cut away but not ripped out to avoid unnecessary tissue damage. The entire hippocampal isolation procedure was completed within one minute. Any remaining cortex was removed using micro-scissors when the preparation was returned to the oxygenated sucrose solution. After dissection, the complete septo-hippocampal preparation was left at room temperature in ACSF bubbled with carbogen for 60 min. For recording, the preparation was transferred quickly to a custom-made submerged recording chamber. Recordings were performed at 30-32°C after an additional 30 min period in the chamber. The preparation was continuously perfused with ACSF (25 ml/min, in mM: 126 NaCl, 24 NaHCO₃, 10 glucose, 4.5KCl, 2MgSO₄, 1.25 NaH₂PO₄, and 2 CaCl₂, pH 7.4, with 95% O₂/5% CO₂) via a gravity-fed perfusion system and maintained at 30°-32°C. Local field potentials were recorded using glass micropipettes (2-6 MΩ) filled with ACSF. Signals were recorded through a differential AC amplifier (A-M Systems), filtered online (0.1 - 500 Hz), and sampled at 5 KHz. The wave-shape of the theta oscillation varied according to frequency and maintained a symmetrical near-sinusoidal shape like *in vivo* theta rhythm. This hippocampal theta was observed using normal artificial cerebrospinal fluid. Power spectra were calculated using the multitaper method (Chronux toolbox) using seven tapers. Integrated theta-band power was calculated in 5-s bins over a period of 2-14 min and the mean spectrum was taken as the grand mean of each animal. Changes in theta power were measured in mV²/Hz.

All drugs came from aliquots of stock solutions (stored at -80°C) and were added to the perfusing artificial ACSF at the concentrations indicated. Base line recording lasted for 20 min followed by 0.5m of pharmacological stimulation (4AP at 150μM) and 20 min recovery after stimulation.

Patch recordings-
Animals were anesthetized with sodium pentobarbital (63 mg/Kg) and perfused transcardially with cold modified artificial cerebrospinal fluid (maCSF) with the following composition (in mM): 238 sucrose, 3KCl, 2.5 MgCl₂, 2 NaHCO₃ and 30 D-glucose, pH 7.4, and bubbled with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). After a maximum of 1.5 min of transcardial perfusion, animals were decapitated, and the brains were removed and dissected in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing the following (in mM): 119 NaCl, 3 KCl, 1.5 CaCl₂, MgCl₂, 25 NaHCO₃ and 30 D-glucose, pH 7.4. One cerebral hemisphere was mounted onto an agar block with a 30 degrees inclination. Slices (400 μm thick), containing the hippocampal formation, were cut with a vibratome (Thermo Scientific HM650V, Germany). Slices were left to recover, at room temperature, for at least 60 min, before experimental manipulation. Whole-cell patch-clamp recordings were obtained using the visual patch-clamp technique with an Axo-clamp 2B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). Cells were aimed for and recorded based on their location CA1 pyramidal layer of the hippocampus. Neurons from Non-Tg and 3xTg-AD mice were recorded. Patch electrodes (4-8 MΩ) were pulled from filamented borosilicate glass tubes (G150F-4, Warner Instruments, Handen, CT) and filled with a solution containing (in mM): 140 K-gluconic acid, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 2 of Na₂ATP, 2 of LiGTP, pH 7.4. Cell characterization was performed by injecting 0-600-pA, 600-ms-long, depolarizing and hyperpolarizing current steps. Recordings were restricted to neurons

located within the CA1/subiculum portion of the hippocampus. Whole-cell recordings were kept for analysis only if the neuron remained stationary throughout the recording, spikes overshoot 0 mV, and access resistance was < 30 MΩ.

Hippocampal dependent behavioral task-For nesting one hour before the dark phase each mouse (n=12) was transferred to an individual cage wood-chip bedding but without environmental enrichment items, we placed a cotton square (5x5 cm) on each cage. The following morning the nest were assessed, according to Deacon as it follows: 1. Nestlet not noticeably touched (>90% intact). 2. Nestlet partially torn up (50-90% remaining intact). 3. Mostly shredded but often no identifiable nest site: <50% of the nestlet remains intact but < 90% is within a quarter of the cage floor area, i.e. the cotton is not gathered into a nest but spread around the cage. Note: the material may sometimes be in a broadly defined nest area, but the critical definition is that 50-90% has been shredded. 4. An identifiable, but flat nest: >90% of the nestlet is torn up, the material is gathered into a nest within a quarter of the cage floor area, but the nest is flat, with walls higher than mouse body height (curled up on its side) on less than 50% of its circumference. 5. A near perfect nest: >90% of the nestlet is torn up, the nest is a crater, with walls higher than mouse body height on more than 50% of its circumference.

For burrowing a day before the test, the cage mates were moved as two separated groups from their home cage to a larger rat cage (26 x 48 x 20 cm) we placed burrow consisted of a plastic black tube, 20 cm long and 7.5 cm in diameter, which was raised 2.5 cm by 2 screws bolted at the open end. The lower end of a burrow was closed off and the tube contained 200g of standard mouse food pellets. We let both groups, do the task during the night to improve burrowing ability and diminish variability between animals. In the next session, three hours before the dark phase of the cycle, mice were placed individually in rat cages containing a burrow, filled with 200g of

food pellets, the animals have access to water but there was not extra food to keep it focus in the task. The amount of food pellets displaced after the first 2 hours of the test was recorded. The burrow was refilled, and the test continued overnight and the following morning, the weight of the pellets remove in the burrow was recorded.

Immunohistochemistry-Additional male mice were anesthetized by pentobarbital and transcardially perfused (PBS followed by 4% PFA). Brains were stored in fixative for 24 hours at 4°C, then in a sucrose solution (30% in PBS) for three days at 4°C, frozen using dimethylbutane and stored at -80°C. Brains were sliced coronally using a freezing microtome at 40µm for light microscopy, or using 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 (IHC) staining. The serial sectioning fraction for IHC was 1/8). Washes in PBS preceded all steps except primary antibody addition. All steps were at room temperature unless otherwise specified.

For immunofluorescence, sections were incubated for 2h with PBS containing 1% normal goat serum, 0.25% Triton X-100 and 0.45% gelatin. Sections were further incubated overnight at 4°C with pS396, AT180 and anti-PARV positive (Termo Fisher and Sigma-Aldrich). Sections were incubated for 2h with secondary antibody (Alexa 488-596 conjugated goat anti-rabbit; 1:2000 dilution). Sections were then mounted on glass slides with Vectashield Mounting Medium, Vectorlabs. Fluorescence was visualized using an epifluorescence (Axioplan2, Zeiss) microscope. The CA1/subiculum/CA3 areas were observed with 20X objective. High magnification photomicrograph was obtained with a 40X objective.

Western Blotting-For Western blot analysis, total protein from hippocampal

preparations were obtained by lysis buffer. A total of 15–20 µg of total protein was loaded on a 10% SDS-PAGE, separated, and transferred onto Immobilon-P transfer membranes (Millipore). The following antibodies and dilutions were used: Tau5 (mAb against total Tau, Abcam, 1:2000. Tau5 antibody detects all six tau isoforms and depending on gel migration different band sizes could be detected) and pS396 (mAb against phosphorylated Tau, ThermoFisher, 1:2000). To evaluate differences in tau phosphorylation equal amounts of total tau protein from 3xTg-AD and Non-Tg animals were loaded. Blots were developed using ECL-Plus (GE Healthcare) or Supersignal West Femto (Pierce). Results were quantified with the

ImageJ software and were normalized to the total tau protein signal.

Data analysis-Using custom MATLAB software, field traces were filtered and analyzed using a Fourier transform. Autocorrelogram of the filtered theta signal was used to derive a value reflecting the degree of rhythmicity. All data were analysed statistically by either, pairwise comparisons with Student's t-tests or Mann-Whitney U-test using STATISTICA 7 (StatSoft, Inc.). In all tests, values of $p < 0.05$ were considered to indicate significance. Bar graphs show experimental mean, with error bars indicating standard error of the mean.

Acknowledgments-We thank to Jessica Gonzalez Norris for proofreading, Kevin Yiron Frias Arroyo for their comments on the manuscript and Dr. Elvira Galarraga Palacio for the use of anti-PARV+ antibody.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT: The authors declare no competing financial interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS AND SUPPORT: S M-R designed the experiments. S M-R, P G-P, A S-G, M M, B O and E O-S performed the experiments. S M-R, P G-P, A S-G, M M, F P-O, S D-C, S W and B O analyzed the data. S M-R wrote the paper. P G-P and A S-G were supported by CONACYT-612271 and 770620. This research was supported by CONACYT-269021 and CONACYT-117, 235789, DGAPA-UNAM IN202018 and Fundación Marcos Moshinsky. S M-R was awarded a Cátedra position from CONACYT, Mexico. Thus, this project was supported by a grant from the National Institute of Minority Health and Health Disparities (G12MD007591) from the National Institutes of Health and by the Semmes Foundation.

REFERENCES

1. Gouw AA, Alsema AM, Tijms BM, et al. EEG spectral analysis as a putative early prognostic biomarker in nondemented, amyloid positive subjects. *Neurobiol Aging*. 2017;57:133-142. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.05.017.
2. Lei M, Xu H, Li Z, et al. Soluble Aβ oligomers impair hippocampal LTP by disrupting glutamatergic/GABAergic balance. *Neurobiol Dis*. 2016;85:111-121. doi:10.1016/j.nbd.2015.10.019.
3. Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Luna-Muñoz J, Acevedo-Aquino MC, Williams S. Phosphorylation of tau protein at sites Ser³⁹⁶⁻⁴⁰⁴ is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014;40(2):121-135. doi:10.1111/nan.12084.
4. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(7):499-509. doi:10.1038/nrn2168.
5. Kaniyappan S, Chandupatla RR, Mandelkow E-M, Mandelkow E. Extracellular low-n oligomers of tau cause selective synaptotoxicity without affecting cell viability.

- Alzheimer's Dement.* May 2017. doi:10.1016/j.jalz.2017.04.002.
6. Chishti MA, Yang D-S, Janus C, et al. Early-onset Amyloid Deposition and Cognitive Deficits in Transgenic Mice Expressing a Double Mutant Form of Amyloid Precursor Protein 695. *J Biol Chem.* 2001;276(24):21562-21570. doi:10.1074/jbc.M100710200.
 7. Mucke L, Selkoe DJ. Neurotoxicity of Amyloid β -Protein: Synaptic and Network Dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(7):a006338-a006338. doi:10.1101/cshperspect.a006338.
 8. Salgado-Puga K, Rodríguez-Colorado J, Prado-Alcalá RA, Peña-Ortega F. Subclinical Doses of ATP-Sensitive Potassium Channel Modulators Prevent Alterations in Memory and Synaptic Plasticity Induced by Amyloid- β . *J Alzheimer's Dis.* 2017;57(1):205-226. doi:10.3233/JAD-160543.
 9. Ittner LM, Ke YD, Delerue F, et al. Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell.* 2010;142(3):387-397. doi:10.1016/j.cell.2010.06.036.
 10. Goedert M. Alzheimer's disease. Pinning down phosphorylated tau. *Nature.* 1999;399(6738):739-740. doi:10.1038/21550.
 11. Mondragon-Rodriguez S, Trillaud-Doppia E, Dudilot A, et al. Interaction of endogenous tau with synaptic proteins is regulated by NMDA-receptor dependent tau phosphorylation. *J Biol Chem.* 2012;287(38):32040-32053. doi:10.1074/jbc.M112.401240.
 12. Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Zhu X, Boehm J. Amyloid beta and tau proteins as therapeutic targets for Alzheimer's disease treatment: Rethinking the current strategy. *Int J Alzheimers Dis.* 2012.
 13. Ittner A, Chua SW, Bertz J, et al. Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid- β toxicity in Alzheimer's mice. *Science (80-).* 2016;354(6314):904-908. doi:10.1126/science.aah6205.
 14. Soler H, Dorca-Arévalo J, González M, et al. The GABAergic septohippocampal connection is impaired in a mouse model of tauopathy. *Neurobiol Aging.* 2017;49:40-51. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.09.006.
 15. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron.* 2003;39(3):409-421. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12895417>. Accessed December 21, 2016.
 16. Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C. The origin of extracellular fields and currents--EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(6):407-420. doi:10.1038/nrn3241.
 17. Goutagny R, Jackson J, Williams S. Self-generated theta oscillations in the hippocampus. *Nat Neurosci.* 2009;12(12):1491-1493. doi:10.1038/nn.2440.
 18. Bénédicte Amilhon B, Huh CYL, Dé F, et al. Parvalbumin Interneurons of Hippocampus Tune Population Activity at Theta Frequency. *Neuron.* 2015;86:1277-1289. doi:10.1016/j.neuron.2015.05.027.
 19. Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Luna-Muñoz J, Acevedo-Aquino MC, Williams S. Phosphorylation of tau protein at sites Ser396-404 is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40(2):121-135. doi:10.1111/nan.12084.
 20. Mondragón-Rodríguez. KG-MPG-PAS-GSWFP-O and S. Characterizing the hippocampal theta's response to carbachol; using a complete septo-hippocampal preparation. *Ing Biomed.* 2017;38(1):208-215. doi:dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.16.
 21. Goutagny R, Gu N, Cavanagh C, et al. Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before A β overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci.* 2013;37(12):1896-1902. doi:10.1111/ejn.12233.
 22. Mahar I, Albuquerque MS, Mondragon-Rodriguez S, et al. Phenotypic Alterations in Hippocampal NPY- and PV-Expressing Interneurons in a Presymptomatic Transgenic

- Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2017;8:327. doi:10.3389/fnagi.2016.00327.
23. Deacon RM, Raley JM, Perry VH, Rawlins JN. Burrowing into prion disease. *Neuroreport.* 2001;12(9):2053-2057. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435945>. Accessed September 14, 2017.
 24. Deacon R. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *J Vis Exp.* 2012;(59):e2607. doi:10.3791/2607.
 25. Deacon RMJ, Croucher A, Rawlins JNP. Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behav Brain Res.* 2002;132(2):203-213. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997150>. Accessed September 14, 2017.
 26. Deacon RMJ, Penny C, Rawlins JNP. Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. *Behav Brain Res.* 2003;139(1-2):139-155. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12642185>. Accessed September 14, 2017.
 27. Deacon RMJ. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat Protoc.* 2006;1(1):118-121. doi:10.1038/nprot.2006.19.
 28. Shiri Z, Lévesque M, Etter G, Manseau F, Williams S, Avoli M. Optogenetic Low-Frequency Stimulation of Specific Neuronal Populations Abates Ictogenesis. *J Neurosci.* 2017;37(11):2999-3008. doi:10.1523/JNEUROSCI.2244-16.2017.
 29. Colgin LL. Rhythms of the hippocampal network. *Nat Rev Neurosci.* 2016;17(4):239-249. doi:10.1038/nrn.2016.21.
 30. Hasselmo ME, Brandon MP. A Model Combining Oscillations and Attractor Dynamics for Generation of Grid Cell Firing. *Front Neural Circuits.* 2012;6:30. doi:10.3389/fncir.2012.00030.
 31. Patel J, Fujisawa S, Berényi A, Royer S, Buzsáki G. Traveling theta waves along the entire septotemporal axis of the hippocampus. *Neuron.* 2012;75(3):410-417. doi:10.1016/j.neuron.2012.07.015.
 32. Cayzac S, Mons N, Ginguay A, Allinquant B, Jeantet Y, Cho YH. Altered hippocampal information coding and network synchrony in APP-PS1 mice. *Neurobiol Aging.* 2015;36(12):3200-3213. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.023.
 33. Engels MMA, Hillebrand A, van der Flier WM, Stam CJ, Scheltens P, van Straaten ECW. Slowing of Hippocampal Activity Correlates with Cognitive Decline in Early Onset Alzheimer's Disease. An MEG Study with Virtual Electrodes. *Front Hum Neurosci.* 2016;10:238. doi:10.3389/fnhum.2016.00238.
 34. Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2003;24(8):1063-1070. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643377>. Accessed January 2, 2017.
 35. Palop JJ, Mucke L. Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 2016;17(12):777-792. doi:10.1038/nrn.2016.141.
 36. Verret L, Mann EO, Hang GB, et al. Inhibitory Interneuron Deficit Links Altered Network Activity and Cognitive Dysfunction in Alzheimer Model. *Cell.* 2012;149(3):708-721. doi:10.1016/j.cell.2012.02.046.
 37. Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Peña-Ortega F, Williams S. Tau, Amyloid beta and Deep brain stimulation: Aiming to restore cognitive deficit in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* August 2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27539594>. Accessed December 13, 2016.
 38. Kazim SF, Chuang S-C, Zhao W, Wong RKS, Bianchi R, Iqbal K. Early-Onset Network Hyperexcitability in Presymptomatic Alzheimer's Disease Transgenic Mice Is Suppressed by Passive Immunization with Anti-Human APP/A β Antibody and by mGluR5 Blockade. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:71. doi:10.3389/fnagi.2017.00071.
 39. Wang Y, Mattson MP. L-type Ca²⁺ currents at CA1 synapses, but not CA3 or dentate

granule neuron synapses, are increased in 3xTgAD mice in an age-dependent manner. *Neurobiol Aging*. 2014;35(1):88-95. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.007.

Table 1

All values are means±SEM; n=5 for pyramidal cells from Non-Tg mice and n=5 from 3xTg-AD mice. Independent *t* test comparisons produced significant differences for spike frequency adaptation and subthreshold membrane oscillations ($p < 0.05$). Maximal firing frequency was calculated from the total number of spikes elicited by 600-msec-long current injections of 200 pA above the firing threshold. Spike frequency adaptation was calculated as the normalized ratio of the instantaneous frequency at the first and last spike intervals in an action potential train (1rst-last/1rst).

Table 1. Membrane and firing properties of pyramidal cells in 3xTg-AD mice

	Non-Tg	3xTg-AD
Resting potential (mV)	-62 ± 4.2	-65 ± 3.8
Membrane resistance (MΩ)	339.56 ± 45.99	350.77 ± 54
Subthreshold membrane oscillations (mV ² ×10 ⁻⁴)	0.11 ± 0.039	0.15 ± 0.031*
Spike frequency adaptation	9.48 ± 1.93	2.22 ± 0.45*

FIGURE 1. Tau phosphorylation was found increased in tau carboxyterminal domain. Tau protein contains multiple phosphorylation sites such as Th231, S235, S393 and S404 (A). Tau phosphorylation levels increased at p30 in 3xTg-AD mice (B). No significant changes were identified in the levels of total tau protein detected by monoclonal antibody TAU5 (B). The increase of tau phosphorylation in the 3xTg-AD group at sites labeled by monoclonal antibody S396 was statistically confirmed (C). Phosphorylation of tau protein at site S396 was found coexisting with the pyramidal neurons from the subiculum/CA1/CA2 region (D). Tau phosphorylation at S396 is clearly seen in the pyramidal cell layer of CA1 (E). Fewer cells were labeled in the subiculum area (F). No significant changes were detected between labeled areas (see insert in F), $n=6$ in each group; all bar graphs show mean±SEM, *: $p < 0.05$ and NS: $p \geq 0.05$. Scale bar 200, 50 and 100 μm.

FIGURE 2. Tau phosphorylation was found increased in tau N-terminus domains. The increase of tau phosphorylation in 3xTg-AD group at sites labelled by monoclonal antibody AT180 was found coexisting with the pyramidal neurons from the CA1/subiculum (A, see magnification in B). Parvalbumin (PARV+) hippocampal interneurons (C) accumulate phosphorylated forms of tau (D and E, white arrows). AT-180 positive PARV+ interneurons (F) revealed punctate accumulation of phospho-tau (G and H, white arrows). Entorhinal neurons displayed lower levels of phospho-tau (I, white arrows). Scale bar A-100, B to E-50, F to H-20 and I-50 μm.

FIGURE 3. Young 3xTg-AD mice were characterized by alterations in theta activity. Representative traces of network oscillatory activity recorded in the CA1/subiculum area of Non-Tg mice (A). Theta band activity magnification of sample window from Non-Tg mice (B). Filtered traces at theta band frequency (3-8 Hz) from Non-Tg mice (C). Representative traces from theta activity recorded at CA1/subiculum of 3xTg-AD mice (D). Theta band activity magnification of sample window from 3xTg-AD mice (E). Filtered traces at theta band frequency (3-8 Hz) from 3xTg-AD mice (F). Spectrograms (400 s) from the same recordings shown above (G and H, respectively). Statistical analysis of theta oscillation strength confirmed lower values in the 3xTg-AD group when compared to the Non-Tg group (I). Statistics showed the increase in

average oscillation frequency from the 3xTg-AD group when compared to the Non-Tg group (J). Micrograph and recording position in the septo-hippocampal preparation (K). Comparison of subthreshold membrane oscillations and spike accommodation in 3xTg-AD and Non-Tg group (L). Graphic representation of subthreshold membrane oscillations in the 3xTg-AD group when compared to the Non-Tg group (M). Graphic representation of spike accommodation in the 3xTg-AD group when compared to the Non-Tg group (N), (all bar graphs show mean±SEM, *: $p < 0.05$).

FIGURE 4. 3xTg-AD mice did not show behavioral abnormalities at 30 days of age. 3xAD-Tg and Non-Tg mice were analyzed in the burrowing (A and B) and nesting tests (C) at 30 days of age. No significant differences were observed in either test between Non-Tg and 3xAD-Tg groups (A, B and C; all bar graphs show mean±SEM, NS: $p \geq 0.05$).

FIGURE 5. 3xTg-AD mice were characterized by a less excitable hippocampal network. Raw traces of theta oscillations recorded in the CA1/subiculum area of Non-Tg (A) and 3xTg-AD mice (B). In the Non-Tg group, 4-AP increased theta amplitude during (A, black square and lower panel) and after stimulation (A, lower panel). In the 3xTg-AD group, 4-AP decreased theta amplitude during (B, black square and lower panel) and after stimulation (B, lower panel). Zero Mg²⁺ did not elicit detectable changes in the amplitude and frequency of theta activity in the 3xTgAD mice (C). The theta power increase for Non-Tg animals under 4-AP stimulation was statistically confirmed (D). No significant changes were observed in theta frequency for the Non-Tg group when treated with 4-AP (E). A statistically significant decrease in theta amplitude was found in the 4-AP 3xTg-AD treated group (F). No significant changes in frequency were detected in the 4-AP 3xTg-AD group (G); all bar graphs show mean±SEM, *: $p < 0.05$ and NS: $p \geq 0.05$.

FIGURE 1

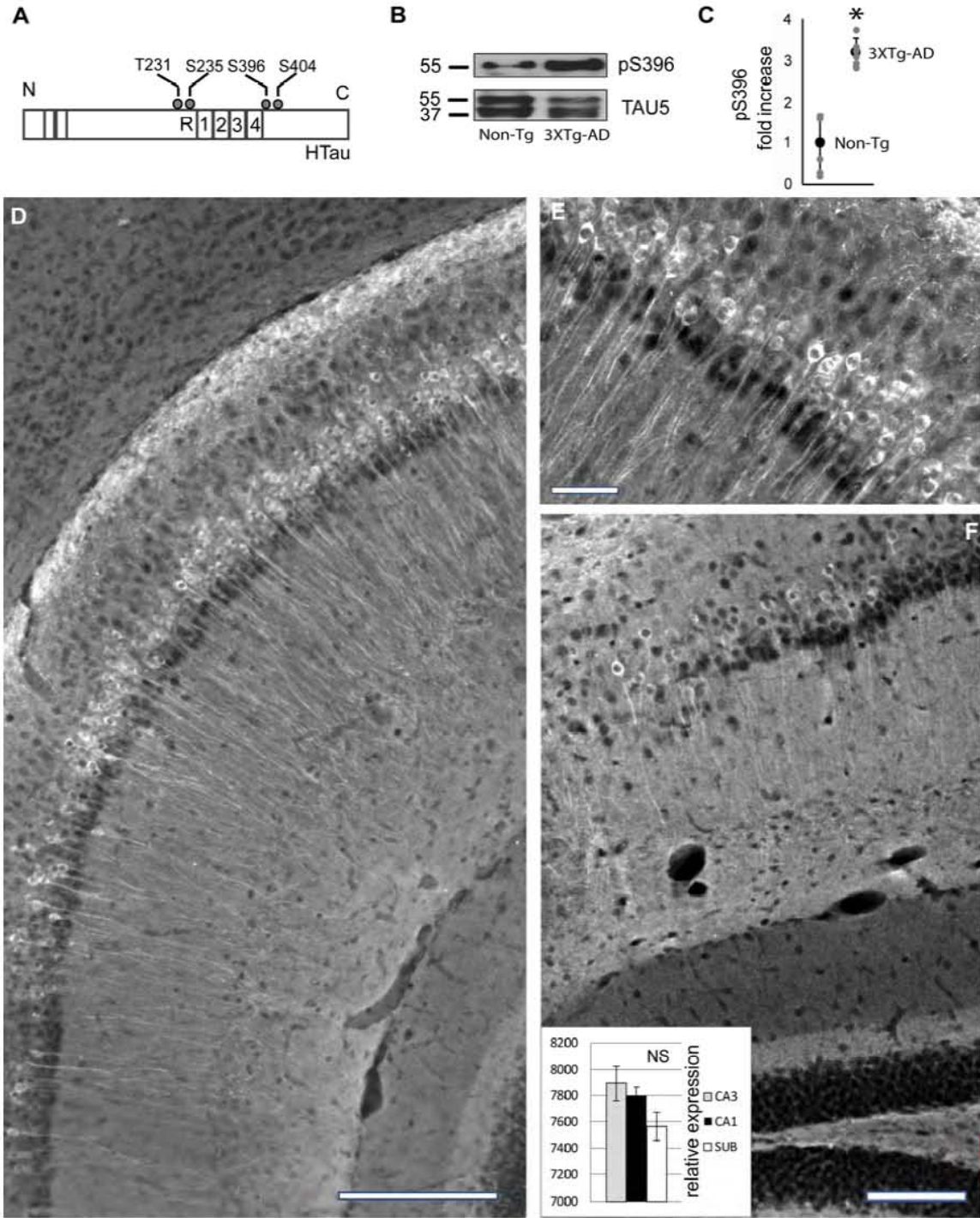


FIGURE 2

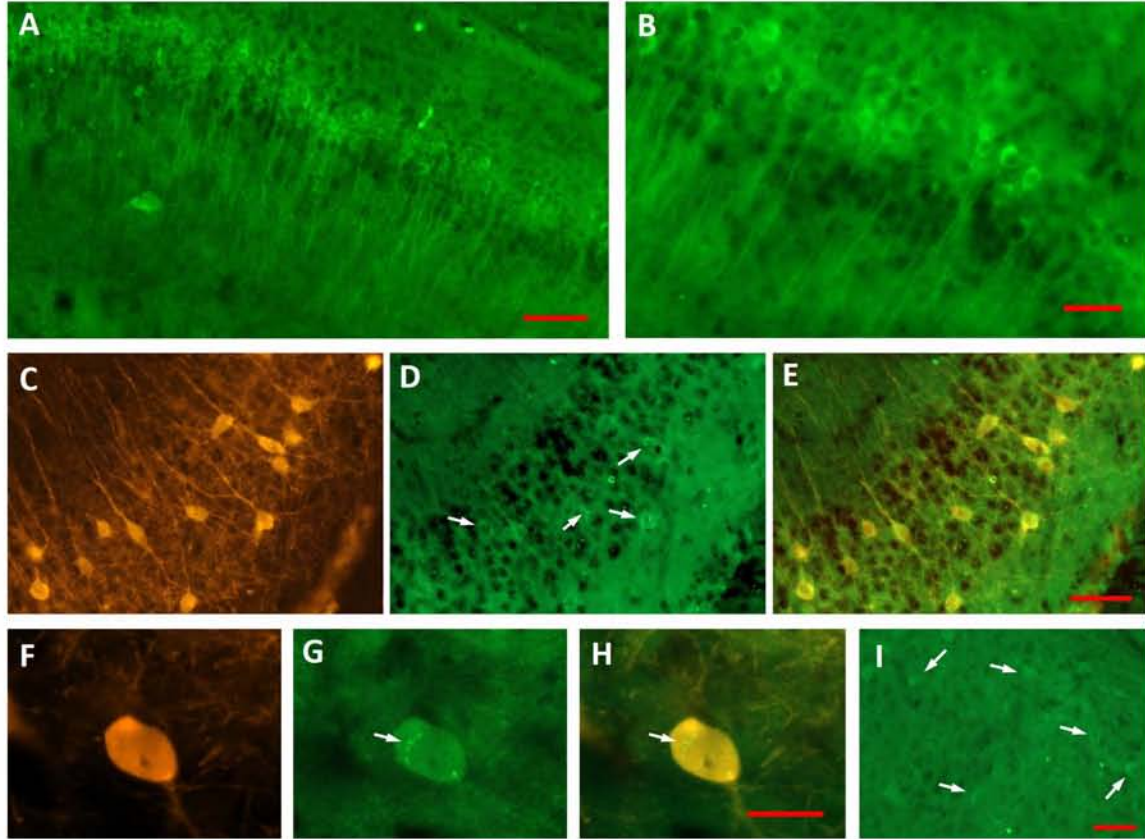


FIGURE 3

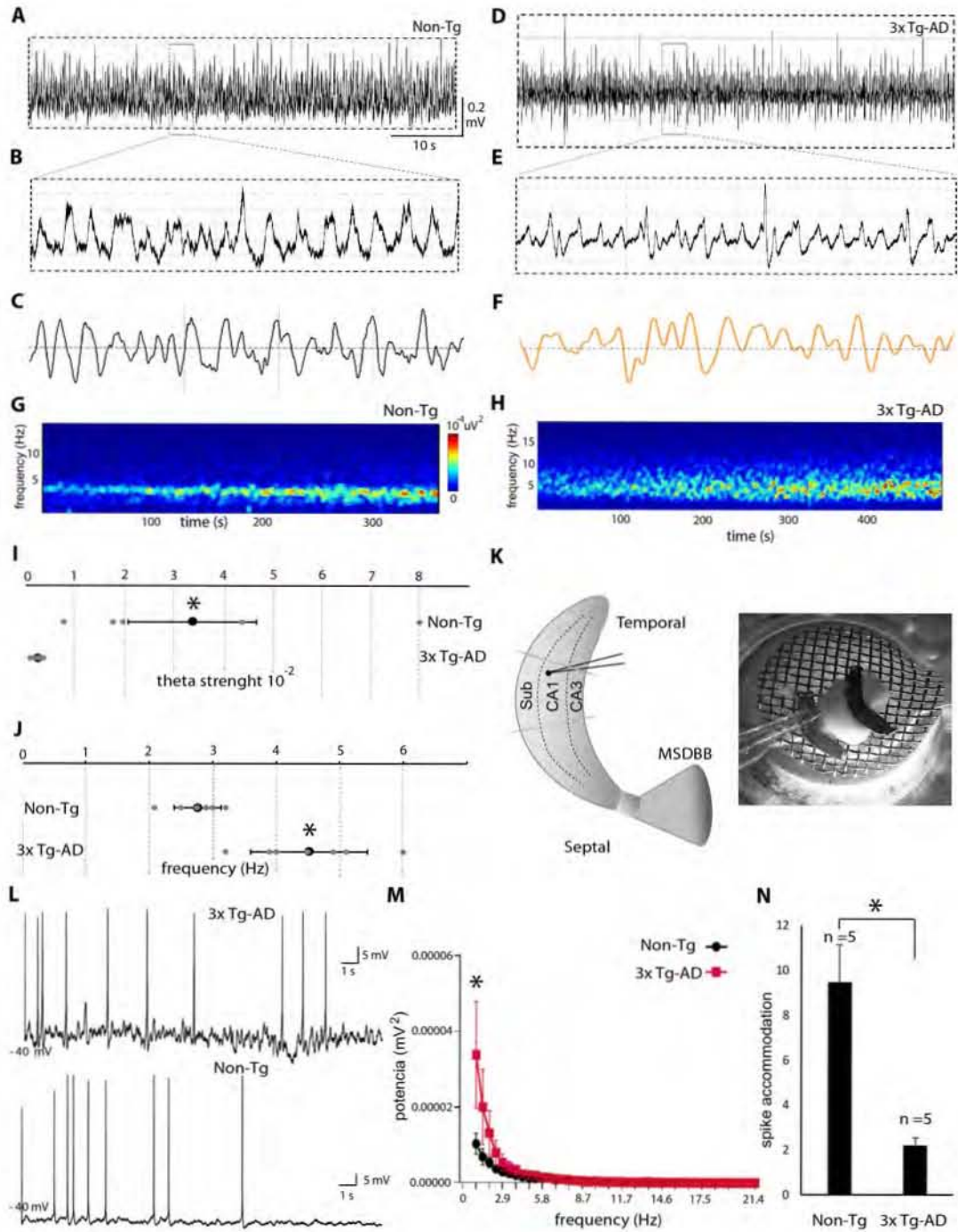


FIGURE 4

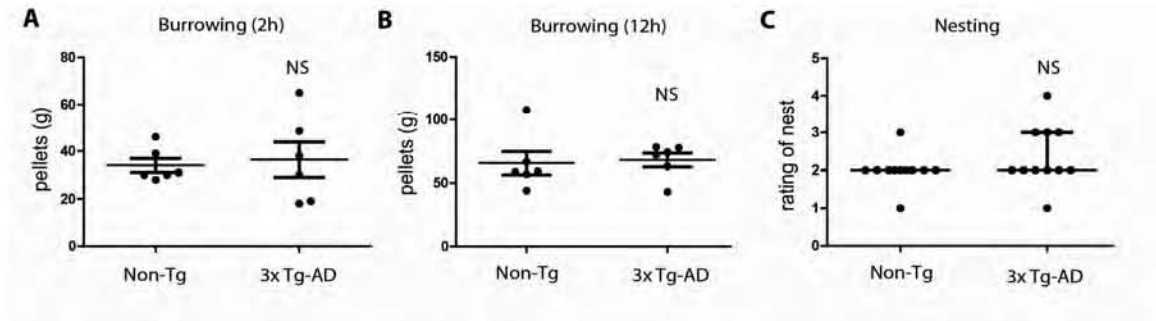
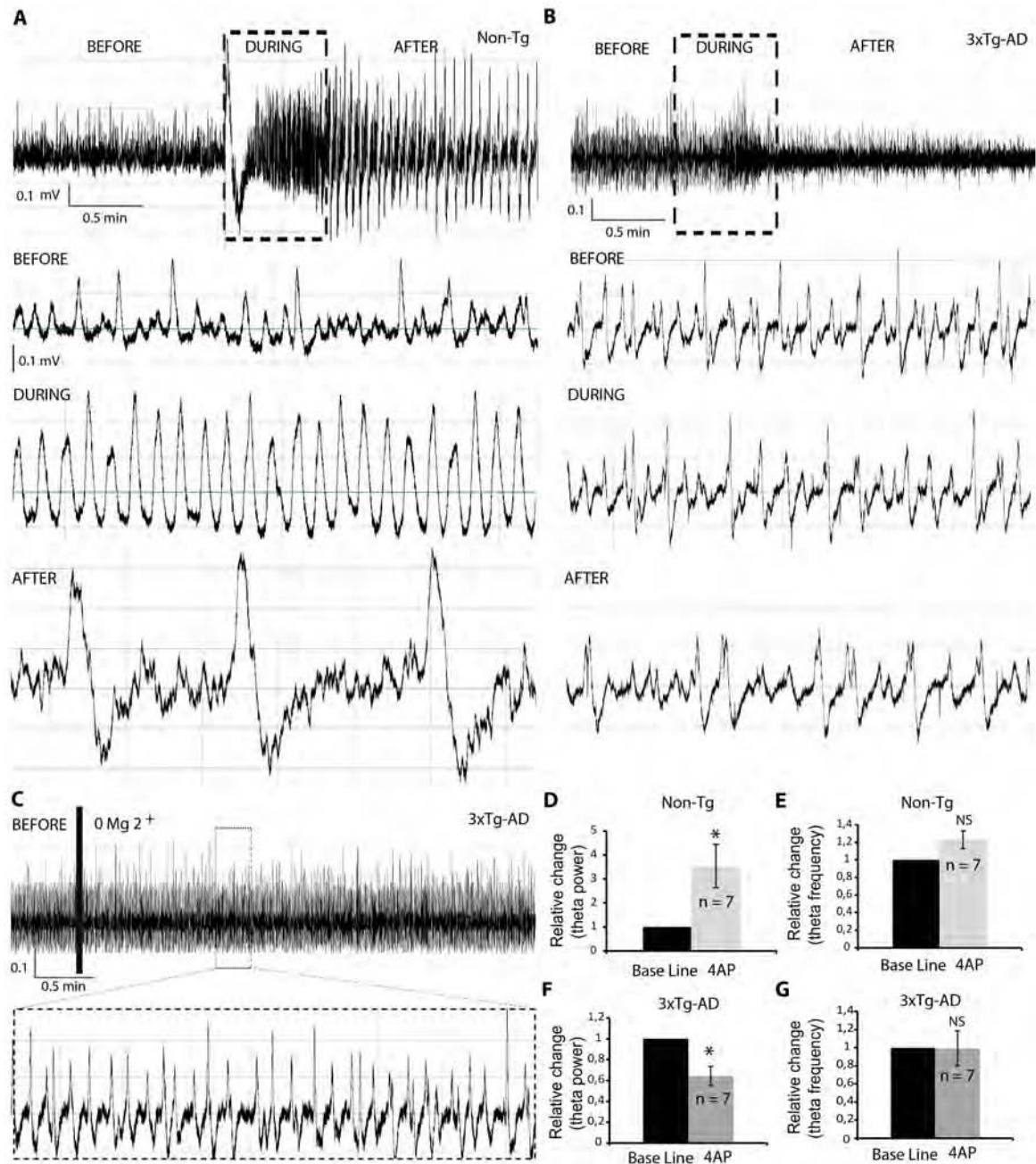


FIGURE 5



Phosphorylation of tau protein correlates with changes in hippocampal theta oscillations and reduces hippocampal excitability in Alzheimer's model

Siddhartha Mondragón Rodríguez, Anahí Salas Gallardo, Perla GONZALEZ PEREYRA, Martín Macías, Benito ORDAZ, Fernando Peña Ortega, Azucena AGUILAR VAZQUEZ, Erika ORTA SALAZAR, Sofia Díaz Cintra, George Perry and Sylvain Williams

J. Biol. Chem. published online April 9, 2018

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.RA117.001187](https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001187)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts