

PROYECTO FINAL DE LICENCIATURA

ANÁLISIS DEL CURSO TEMPORAL DE LA FORMACIÓN DE AGREGADOS DE LA PROTEÍNA TAU Y DETERMINACIÓN DE FENOTIPOS TEMPRANOS EN MODELO MURINO DE TAUPATÍA.

Loch, Delfina – LU1078767

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Avale, María Elena, INGEBI-CONICET

Co-Tutor:

Gelman, Diego Matías, IBYME-CONICET

Abril 2021



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres por darme la posibilidad de haber realizado la carrera de mis sueños. Por acompañarme y estar siempre presente cuando los necesité. Agradecerle, especialmente, a mi hermana Cami, por estar a mi lado tanto en los momentos más lindos, como en los más complicados de este camino. Y a todo el resto de mi familia por acompañarme de distintas maneras.

Quiero darle las gracias a Elena por recibirme en su laboratorio y darme ese espacio para dar mis primeros pasos en la investigación científica con tanta dedicación y pasión. A Caro, Ani y Javi por haberme aconsejado en tantas oportunidades y por la predisposición a ayudarme.

A flor, que, más que una compañera facultativa, se convirtió en mi hermana. Por todas esas horas de estudio, entregas infinitas de trabajos prácticos y noches de repaso previas a los exámenes. Siempre motivándonos, disfrutando y aguantando nuestros ataques de llanto.

A mis amigos de siempre, por interesarse y estar cada segundo de este proceso.

A Fran, por compartir cada alegría y también cada momento donde las cosas se hicieron más difíciles. Porque todo fue más fácil sabiendo que él estaba ahí.

Un agradecimiento sumamente especial a mis ratoncitos. Se convirtieron en mis minis compañeros de laboratorio con los que trabajaba durante semanas por horas!

Por último, a mi director de Carrera Fede Prada, por ser un modelo a seguir. Dando consejos y ayudándonos a construir este hermoso camino educativo para ser los mejores profesionales.

Resumen

Las taupatías son trastornos neurodegenerativos caracterizados por el metabolismo anormal de la proteína tau, que se acumula en depósitos neuronales insolubles. En condiciones normales, tau participa en numerosas funciones neuronales. El procesamiento postranscripcional de Tau por splicing alternativo del exón 10 genera dos variantes de isoformas presentes en cantidades iguales en el cerebro humano adulto normal (conocidas como 3R y 4R, en función de la presencia de 3 o 4 dominios de unión a microtúbulos, respectivamente). Varias taupatías se han asociado con defectos en el splicing alternativo del transcrito primario de Tau, lo cual genera desequilibrios entre las isoformas 3R y 4R. Estas patologías presentan severas disfunciones neuronales que afectan distintos núcleos cerebrales. El objetivo de este proyecto es describir los fenotipos tempranos en un modelo de ratón transgénico hTAU que presenta desequilibrios de isoformas 3R:4R. El ratón hTAU porta un transgén codificante para Tau humana, en un fondo genético nulo para tau murina, es decir que solamente expresa Tau humana. Si bien estos ratones producen todas las isoformas de Tau humana, presentan un defecto en el splicing alternativo, generando un exceso de las isoformas 3R por sobre la 4R. Dicho desbalance se asocia al desarrollo de patología Tau y fenotipos anormales en ratones seniles. En este trabajo nos propusimos investigar el desarrollo de fenotipos tempranos en este modelo, con relación a los núcleos cerebrales tempranamente afectados. Evaluamos el rendimiento olfativo como un indicador temprano de neurodegeneración dado ha sido propuesto como un síntoma prodrómico en varias patologías neurodegenerativas. Además, realizamos una batería de pruebas para detectar ansiedad, inhibición conductual y deterioro cognitivo, en ratones hTAU de 6 meses de edad. Los ensayos conductuales fueron complementados con estudios de imágenes cerebrales *in vivo* por tomografía de emisión de positrones (PET) y ensayos neuroquímicos post-mortem (inmunohistoquímica y western blot) para detectar la presencia de tau hiperfosforilada.

Los resultados obtenidos en los abordajes experimentales realizados en este trabajo indican la presencia de fenotipos tempranos asociados déficits cognitivos y sensoriales en el modelo hTAU murino. Asimismo, demostramos la presencia de cambios metabólicos significativos en determinados núcleos cerebrales en etapas tempranas del desarrollo de la taupatía, lo cual permite validar esta estrategia como posible herramienta de diagnóstico precoz.

Abstract

Tauopathies are neurodegenerative disorders characterized by abnormal metabolism of the tau protein, which accumulates as insoluble neuronal deposits. Under normal conditions, tau participates in several neuronal functions. Post-transcriptional processing of Tau by alternative splicing of exon 10 generates two isoform variants present in equal amounts in the normal adult human brain (known as 3R and 4R, based on the presence of 3 or 4 a microtubule-binding repeats, respectively). Several tauopathies have been associated with defects in the alternative splicing of the primary Tau transcript that generates imbalances between the 3R and 4R isoforms. Those pathologies involve severe neuronal impairments which affect specific brain nuclei. The aim of this project is to describe early phenotypes in a hTAU transgenic mouse model. This model carries a transgene coding for human Tau, in a null genetic background for murine tau, that is, they only express human Tau. Although these mice produce all the human Tau isoforms, they present a defect in the alternative splicing of exon 10, yielding an excess of 3R over 4R isoforms. This imbalance is associated with the development of Tau pathology and abnormal phenotypes. In this work we set out to investigate the development of early phenotypes in this model, in relation to the early affected brain nuclei. We evaluated olfactory performance as an early indicator of neurodegeneration since it has been proposed as a possible marker of neurodegenerative pathologies. In addition, we performed a battery of tests to detect anxiety, behavioral inhibition, and cognitive impairment in 6-month-old hTAU mice. The behavioral tests were complemented with *in vivo* brain imaging studies by positron emission tomography (PET) and post-mortem neurochemical tests (immunohistochemistry and western blot) to detect the presence of hyperphosphorylated tau.

The results obtained in the experimental approaches carried out in this work indicate the presence of early phenotypes associated with cognitive and sensory deficits in the murine hTAU model. In addition, we described metabolic changes in specific brain nuclei in early stages of the development of tauopathy, which validates this strategy as a potential early biomarker of tau pathology in the brain.

CONTENIDOS

Agradecimientos.....	1
Resumen	2
Abstract	3
CONTENIDOS	4
1 Antecedentes	6
1.1.1 Breve introducción a las taupatías.....	6
1.1.2 Principales signos clínicos de taupatías.....	6
1.1.3 La proteína Tau y sus funciones.....	7
1.1.4 Organización génica y proteica	7
1.1.5 Proteína Tau patológica.....	10
1.1.6 Modelos animales de taupatías.....	12
1.1.7 Disfunción olfativa temprana en enfermedades neurodegenerativas	13
1.1.8 Disfunciones de la corteza prefrontal en las taupatías	17
1.1.9 Metabolismo de glucosa.....	17
2 Hipótesis y objetivos	19
3 Metodología.....	19
3.1 Lugar de trabajo.....	19
3.1.1 Laboratorio 222	19
3.1.2 Bioterio.....	20
3.1.3 Cuarto de comportamiento	20
3.2 Materiales y métodos.....	21
3.2.1 Modelo de ratón.....	21
3.2.2 Genotipificación de ratones transgénicos.....	22
3.2.3 Ensayos comportamentales	24
3.2.4 PET: tomografía por emisión de positrones para animales de laboratorio.....	30
3.2.5 Obtención de cerebro fijado por perfusión cardiaca.	32
3.2.6 Inmunohistoquímica: reactivos y protocolo	33
3.2.7 Western blot: reactivos y protocolo.....	34
4 Resultados	37
4.1.1 Ensayos de comportamiento.....	37
4.1.2 Ensayos de olfacción.....	43

4.1.3	Análisis de actividad metabólica por microPET	49
4.1.4	Detección de tau hiperfosforilada por Inmunohistoquímica	50
4.1.5	Western-Blot	54
5	Discusión	56
6	BIBLIOGRAFÍA	62

1 Antecedentes

1.1.1 Breve introducción a las taupatías

Las taupatías se refieren a una amplia gama de enfermedades fenotípicamente diversas caracterizadas por la agregación aberrante de la proteína tau en neuronas y / o glía (Strang, Golde and Giasson 2019)

Tau es el componente principal de los ovillos neurofibrilares (NFT, por sus siglas en inglés), que son inclusiones proteicas hiperfosforiladas que se encuentran en varias taupatías. En condiciones patológicas, puede cambiar la estructura, conformación y/o plegamiento de tau, lo cual lleva a que esta se hiperfosforile y agregue, formando estos agregados insolubles (NFTs). La taupatía se ha considerado un sello distintivo esencial en la neurodegeneración y el envejecimiento normal del cerebro (Saha and Sen 2019)

Hoy en día, el diagnóstico de este tipo de enfermedades neurodegenerativas está en aumento, probablemente ya que una mayor longevidad está aumentando la edad de las poblaciones en todo el mundo y la edad es un factor de riesgo importante para estas afecciones.

Entre las taupatías más frecuentes se incluye a la enfermedad del alzhéimer; degeneración lobar frontotemporal con inclusiones de tau (FTLD-tau) como la enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva (PSP) y degeneración cortico-basal (CBD); y algunas formas genéticas de la enfermedad de Parkinson (Lee, Goedert and Trojanowski 2001; Rajput et al. 2006; Santpere and Ferrer 2009).

1.1.2 Principales signos clínicos de taupatías

Las taupatías abarcan un grupo amplio de patologías, que pueden afectar primariamente a diferentes núcleos cerebrales, de manera que se las puede subdividir en aquellas con fenotipos principalmente motores, como es el caso de PSP y CBD, en los que se ven afectados principalmente los ganglios basales y generan signos de parkinsonismo atípico. Por otro lado la mayoría de las taupatías presentan síntomas comportamentales y cognitivos, destacándose la falta de inhibición comportamental cuando se ve afectada la corteza prefrontal, tal es el caso de la enfermedad de Pick y demencia frontotemporal (FTDL-tau), o bien la memoria como en

el caso de enfermedad de Alzheimer que compromete principalmente a la corteza entorrinal y el hipocampo (Thibodeau, Chertkow and Léger 2009)

1.1.3 La proteína Tau y sus funciones

La proteína tau asociada a microtúbulos se identificó como un factor de ensamblaje de microtúbulos a mediados de la década de 1970 (Weingarten et al. 1975; Witman et al. 1976). La década siguiente se vio la identificación inicial del gen tau de la proteína asociada a microtúbulos (MAPT) que codifica tau (Drubin, Caput and Kirschner 1984; Goedert et al. 1988)

Tau se expresa en el sistema nervioso central y periférico y, en menor grado, en riñón, pulmón y testículo (Gu, Oyama and Ihara 1996). Es más abundante en axones neuronales (Lee, Goedert and Trojanowski 2001; Trojanowski et al. 1989) pero también se puede encontrar en compartimentos somato-dendríticos neuronales (Tashiro et al. 1997) y en oligodendrocitos (Klein et al. 2002). En las neuronas es donde juegan un papel importante en el ensamblaje de monómeros de tubulina en microtúbulos para constituir la red de microtúbulos neuronales. Los microtúbulos participan en el mantenimiento de la forma celular y sirven de carriles para el transporte axonal (Buée et al. 2000). Al unirse a los microtúbulos, que están formados por protofibrillas de heterodímeros α y β -tubulina, se ha postulado que tau confiere estabilidad estructural a los microtúbulos (Weingarten et al. 1975). Por lo tanto, cumple funciones esenciales en la formación y estabilización de los microtúbulos, en el transporte axonal y la señalización del tráfico celular (Medina, Hernández and Avila 2016; Morris et al. 2011)

Tau se encuentra nativamente desplegada y unida a los microtúbulos a través de sus repeticiones en tándem, con la mitad amino terminal y el extremo carboxi formando la llamada capa difusa del filamento. Se une a la región carboxi-terminal de la tubulina a través de una región conocida como dominio de unión a microtúbulos (Goedert et al. 1988), y se localiza principalmente en los microtúbulos axonales en el cerebro sano, mientras que en condiciones patológicas se concentra anormalmente hiperfosforilada, acumulada en el compartimento somato-dendrítico de neuronas.

1.1.4 Organización génica y proteica

La estructura proteica de tau se puede subdividir en cuatro dominios (Ilustración 1): el N-terminal, el dominio rico en prolina, el de unión a microtúbulos y el C-terminal. Tau es rica

en aminoácidos cargados polares, mostrando un carácter generalmente básico, excepto por los primeros 120 aminoácidos que son ácidos (Mandelkow and Mandelkow 2012)

Aproximadamente el 50% de la secuencia comprende solo de cinco aminoácidos: glicina, lisina, prolina, serina y treonina. El gen único que codifica tau, MAPT, se encuentra en el cromosoma 17q21-22 y consta de 16 exones (Bodea et al. 2016).

La proteína tau está codificada por el gen *MAPT*. Los exones expresados constitutivamente de *MAPT* son 1, 4, 5, 7, 9, 11 y 12, mientras que los exones 2, 3 y 10 se empalman alternativamente (por *splicing* alternativo), dando lugar a seis isoformas principales específicas del cerebro adulto, que van desde 352 a 441 aminoácidos (Goedert et al. 1992). Uno de los exones más regulados, espacial y temporalmente, mediante *splicing* alternativo es el exón 10, que codifica para el segundo dominio de unión a los microtúbulos.

La mitad C-terminal de tau está compuesta por motivos de unión a tubulina, representados por tres o cuatro dominios repetidos y una cola C-terminal. La presencia de los motivos repetidos se correlaciona con la capacidad de tau para unir, y así estabilizar, microtúbulos, con la isoforma 4R incrementando la interacción con los microtúbulos (Goedert et al. 1989; Goedert and Jakes 1990).

La inclusión del exón 10 se traduce en una isoforma de Tau con 4 dominios de unión a microtúbulos en el extremo carboxi-terminal (4R) y que en general se la relaciona con una mayor estabilidad ya que tiene una mayor fuerza de interacción con la tubulina. Por otro lado, la exclusión del exón 10 deriva en la formación de la isoforma que consta de 3 dominios de unión a microtúbulos (3R) y que se relaciona con una mayor plasticidad axonal, ya que la unión a microtúbulos es menos estable.

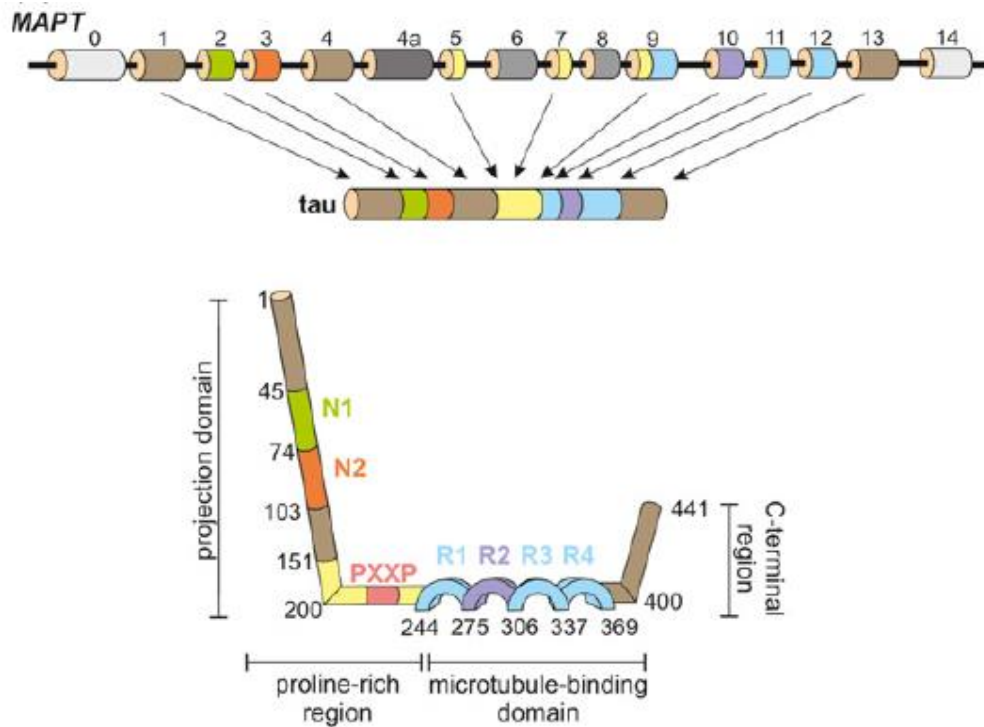


Ilustración 1 - Estructura del gen (MAPT) y de la proteína Tau (Bodea et al. 2016)

La producción de un mayor contenido de isoformas 3R en el embrión puede encontrarse relacionada con una mayor plasticidad que se requiere para la formación del proceso neuronal y la elongación de las neuritas durante el desarrollo del sistema nervioso. En el cerebro adulto, el cambio hacia la incorporación del exón 10, podría llevar a una mayor estabilidad de los microtúbulos.

La producción de diferentes isoformas de Tau es dependiente del tejido, así como del estadio del desarrollo y se encuentra relacionada mayormente según su función en la plasticidad del citoesqueleto durante el crecimiento neurítico y la sinaptogénesis. Tanto en el cerebro del ratón como en el del humano durante la embriogénesis se expresa la isoforma más corta de Tau: con 3 repeticiones y sin el inserto en el amino-terminal (3R/0N).

Durante el desarrollo del cerebro humano, predomina la producción de tau 3R, mientras que en el cerebro humano adulto, 3R y 4R se encuentran en una proporción aproximadamente equimolar, tanto a nivel de ARNm como de proteína (Avila 2009). Los cambios en esta proporción pueden provocar neurodegeneración y demencia (Buée et al. 2000). Entonces, en condiciones fisiológicas, se conoce que en el cerebro humano adulto los niveles relativos de las

isoformas 3R y 4R son equivalentes entre sí, lo que determinaría un balance entre las funciones de estas isoformas.

Además de los microtúbulos, tau también puede unirse a otras moléculas (Morris et al. 2011; Mandelkow and Mandelkow 2012). Curiosamente, la tau interactúa con la actina, como se demostró tanto *in vitro* (Zmuda and Rivas 2000; Sharma et al. 2007) como *in vivo* (Fulga et al. 2007). Esta interacción también está mediada *in vivo* por el dominio de unión de microtúbulos, posiblemente contribuyendo a una función asociada al citoesqueleto (He et al. 2009).

1.1.5 Proteína Tau patológica

Muchos casos de patología de tau se asocian a alteraciones postraduccionales de la proteína, como el estado de fosforilación o cambios en los procesamientos postranscripcionales del gen codificante para Tau (MAPT) (Lee, Goedert and Trojanowski 2001).

Aunque tau está intrínsecamente desordenada y se encuentre de forma nativa desplegada, puede adoptar una estructura similar a un “clip” (Jeganathan et al. 2006). Es probable que las mutaciones del gen MAPT sin sentido, que alteran la estructura de “clip” propuesta, promuevan la formación de agregación e inclusión (Strang, Golde and Giasson 2019).

Aunque se conoce que la proteína tau hiperfosforilada se encuentra acumulada en agregados (Grundke-Iqbal et al. 1986; Bancher et al. 1989), los mecanismos responsables de esta agregación no se comprenden completamente. Se cree que una de las razones del aumento anormal de la fosforilación de tau podría ser un desequilibrio en la actividad o regulación de quinasas y fosfatasas (Lee et al. 2011).

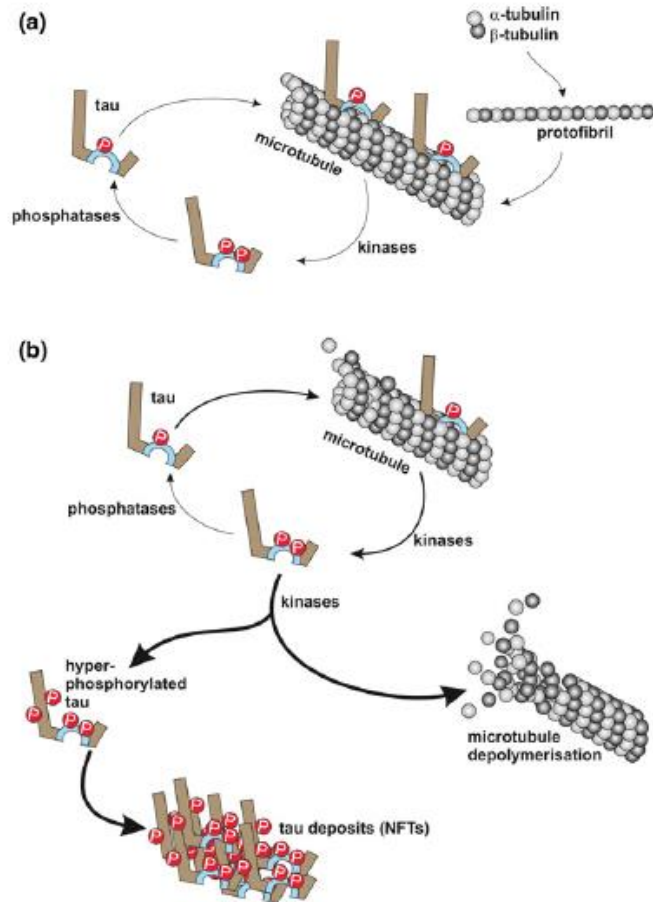


Ilustración 2 - Diagrama de la dinámica Tau- microtúbulos en condiciones sanas (a) y patológicas (b) (Bodea et al. 2016)

La mayoría de las mutaciones están localizadas en los exones 9-12 que codifican las repeticiones, y en los intrones adyacentes. Las mutaciones se dividen en dos grupos: las que tienen un efecto directo en el nivel de proteína y las que tienen una influencia en el splicing alternativo del pre-ARNm de Tau. Las mutaciones que actúan a nivel de la proteína cambian o eliminan aminoácidos de Tau, reduciendo su capacidad para interactuar con los microtúbulos (Hasegawa, Smith and Goedert 1998), esto provoca una pérdida parcial de la función de Tau que puede ser suficiente para causar su agregación anormal. Las mutaciones con un efecto sobre el procesamiento del ARN pueden ser intrónicas o exónicas y modificar el splicing alternativo del exón 10 de *MAPT*, causando un cambio en la relación de isoformas 3R y 4R (Hutton et al. 1998; Spillantini et al. 1998).

Resulta particularmente interesante que este desbalance 4R/3R conduce a la neurodegeneración independientemente de cuál sea la isoforma predominante (Gasparini, Terni and Spillantini 2007).

Además, los factores extracelulares impactan en la patología de tau, donde los depósitos extracelulares beta amiloide (Ab) desencadenan procesos patológicos intraneuronales dependientes de tau (Ittner et al. 2010). De hecho, una fracción significativa del conocimiento sobre los mecanismos patológicos de tau se deriva de estudios en modelos de Alzheimer, y cada vez está más claro que la patología de tau es muy compleja y dinámica. Incluso en condiciones fisiológicas, además de la fosforilación, tau puede sufrir modificaciones postraduccionales que incluyen ubiquitinación, nitración, acetilación, oxidación y otras (Morris et al. 2015).

1.1.6 Modelos animales de taupatías

El desarrollo de modelos animales experimentales que reproducen las características de las enfermedades neurodegenerativas es útil para dilucidar sus mecanismos patogénicos e investigar posibles intervenciones terapéuticas. En el campo de las taupatías, se han descrito varios modelos de ratones transgénicos que expresan la isoforma tau más larga (4R-tau) o la más corta (3R-tau).

Los modelos de ratones transgénicos de taupatías exhiben similitudes con los mecanismos patológicos involucrados en la enfermedad de Alzheimer, especialmente en lo que respecta al direccionamiento intracelular aberrante de las proteínas tau. Sin embargo, y como la mayoría de los modelos animales, no reproducen por completo todas las características que conducen a la aparición de taupatías.

Existen numerosos modelos animales que representan la pérdida o ganancia de función de Tau en el ratón.

Se han generado varias líneas diferentes de ratones mutantes nulos (*knock out*) de tau como modelo de estudio de **perdida de función**. En estos modelos se observa debilidad muscular, déficit motor, hiperactividad y dificultades de aprendizaje (Ikegami, Harada and Hirokawa 2000).

Los primeros análisis de los ratones TauKO llevaron a proponer que la eliminación del gen *MAPT* no conlleva a importantes efectos funcionales por lo cual podría presentar una

alternativa terapéutica para las taupatías (Paglini et al. 2000). Sin embargo, se demostró que los ratones TauKO a partir de los 7 meses presentan déficits en el sistema nigroestriatal (Lei et al. 2012), evidenciado por fenotipos motores severos y pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNpc). No obstante, otros laboratorios no han logrado replicar estos resultados en otras líneas de TauKO (Li et al. 2014) lo cual ha generado un intenso debate acerca del papel funcional de Tau en el cerebro adulto, principalmente relacionado a los fenotipos motores.

En cuanto a los modelos murinos para estudiar la **ganancia de función tóxica** de Tau, se han desarrollado varios ratones transgénicos que portan una o varias mutaciones de Tau en diferentes versiones.

En este trabajo elegimos utilizar el modelo murino hTAU (human Tau) dado que representa una excelente herramienta para estudiar el efecto neuroquímico y funcional del desbalance entre las isoformas de Tau 3R y 4R, sin sobreexpresión de formas mutantes de Tau. Los ratones hTAU expresan el gen humano MAPT normal a partir de un transgén PAC (Cromosoma Artificial derivado de bacteriófago P1) en bajo número de copias, en un fondo mutante nulo para el gen MAPT murino (Andorfer et al. 2003). A su vez, el PAC utilizado como transgén porta la secuencia completa de MAPT humano, con todos sus intrones y exones, su promotor y zonas regulatorias lejanas.

1.1.7 Disfunción olfativa temprana en enfermedades neurodegenerativas

En los últimos años se ha reportado la presencia de disfunciones olfativas como indicador temprano de enfermedades neurodegenerativas. Como resultado de pruebas cuantitativas, ahora se sabe que la mayoría de las personas mayores de 65 años tienen algún tipo de disfunción olfativa (Doty and Kamath 2014). Esta disfunción va desde una pérdida grave, como se observa en la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Hawkes 2006), hasta una pérdida relativamente pequeña, como se observa en la parálisis supranuclear progresiva (Doty 2017).

Sin embargo, es de particular importancia para los neurólogos el hecho de que la disfunción olfativa puede ser un signo clínico, o en algunos casos preclínico, de enfermedades neurológicas como las ya mencionadas y la enfermedad de Huntington, la demencia vascular y

el trastorno idiopático del comportamiento del sueño con movimientos oculares rápidos (Banks et al. 2016).

La disfunción olfativa en procesos neurodegenerativos está relacionada con el depósito de proteínas patológicas, α -sinucleína, proteína tau hiperfosforilada y/o proteína neurofilamentosa en las áreas relacionadas al olfato, como el bulbo olfatorio o la corteza piriforme, caracterizadas por ovillos neurofibrilares (NFTs), cuerpos de Lewy y neuritas que inducen una cascada compleja de procesos moleculares que incluyen daño oxidativo, neuro-inflamación y alteración citosólica de los procesos celulares que conducen a la muerte celular (Attems, Walker and Jellinger 2014). Además, ha sido reportada incluso antes del desarrollo de los déficits cognitivos y de la aparición de lesiones neuropatológicas, características de estas enfermedades (Devanand et al. 2000).

En muchos estudios post mortem de pacientes con Alzheimer, se ha descrito patología tau en el sistema olfativo, incluyendo el bulbo olfativo, el núcleo olfativo anterior y la corteza piriforme (Saiz-Sanchez et al. 2016). También en otras taupatías, como la demencia frontotemporal, enfermedad de pick y PSP, se reportaron alteraciones olfativas asociadas a la progresión de la patología tau (Luzzi et al. 2007; Pardini et al. 2009).

Existe evidencia reciente que muestra disfunción olfativa en los ratones transgénicos portadores de la mutación *MAPT* P301S que está asociada a patología tau progresiva y neurodegeneración, incluyendo el bulbo olfatorio y en la corteza piriforme a una edad temprana (Yang, Kuan and Spillantini 2016).

La disfunción olfativa aparece al principio del proceso degenerativo y, por tanto, se considera un signo prodrómico de neurodegeneración (Doty 2008). Descifrar las rutas moleculares que subyacen a los síntomas del déficit olfativo temprano es esencial para desarrollar diagnósticos tempranos y nuevos blancos terapéuticos.

1.1.7.1 Anatomía sistema olfativo

El nervio olfatorio (par craneal I) está compuesto por 6 a 10 millones de células receptoras olfativas cuyas dendritas ciliadas y cuerpos celulares se albergan dentro de un neuroepitelio especializado que recubre los huecos más altos de la nariz. Las células receptoras olfatorias se entremezclan entre otros tipos de células, incluidas las células de soporte que estabilizan el epitelio. Los axones de las células receptoras olfativas están encapsulados por

fascículos, denominados fila, que ingresan al cerebro a través de los agujeros de la placa cribiforme y terminan dentro de los glomérulos del bulbo olfatorio.

En muchas especies, las células intrínsecas al bulbo se reponen mediante la diferenciación de neuroblastos que ingresan al núcleo del bulbo a través de la corriente migratoria rostral desde su origen dentro de la zona subventricular del cerebro. Sin embargo, el grado en el que este proceso ocurre en los seres humanos es controvertido. Tal reposición, junto con la regeneración de las células receptoras olfativas, hace de los bulbos olfatorios una de las regiones del cerebro de los mamíferos con mayor actividad metabólica (Doty 2017).

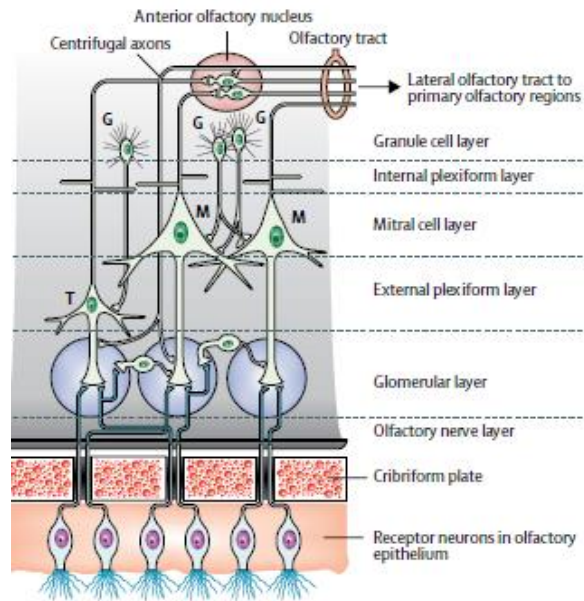


Ilustración 3 - Diagrama de los principales tipos de células y capas del bulbo olfatorio, la primera estación de relevo del sistema olfativo (Doty 2017)

Los cambios neuropatológicos de la disfunción olfativa en las enfermedades neurodegenerativas pueden afectar el epitelio olfatorio, el bulbo / tracto olfatorio, las cortezas olfativas primarias y sus objetivos secundarios.

Las neuronas sensoriales olfativas detectan olores tras la inhalación de aire en la cavidad nasal. Esta información primaria se procesa en el bulbo olfatorio y las células mitrales la envían por sus axones a la corteza olfatoria. El núcleo olfatorio anterior se distribuye en diferentes partes durante el trayecto del bulbo olfatorio, pedúnculo olfatorio y corteza olfatoria y constituye el primer relé de la información olfatoria. En el lóbulo frontal se localiza el tubérculo

olfatorio que constituye parte del estriado ventral y contiene las islas de Calleja (con función desconocida).

El sistema olfativo humano involucra núcleos anatómicos ubicados en diferentes áreas: la parte anterior, lóbulo frontal y la parte posterior, lóbulo temporal (Ilustración 4). El bulbo olfatorio es la primera entrada de estímulo desde la zona anterior hacia la parte frontal de la corteza piriforme. Dentro del lóbulo temporal se ubica la corteza piriforme y la amígdala. Las últimas entradas olfativas del bulbo olfatorio llegan a la parte rostral de la corteza entorrinal, que a su vez forma la conexión principal con el sistema límbico a través de la vía perforante (Ilustración 4, sección azules).

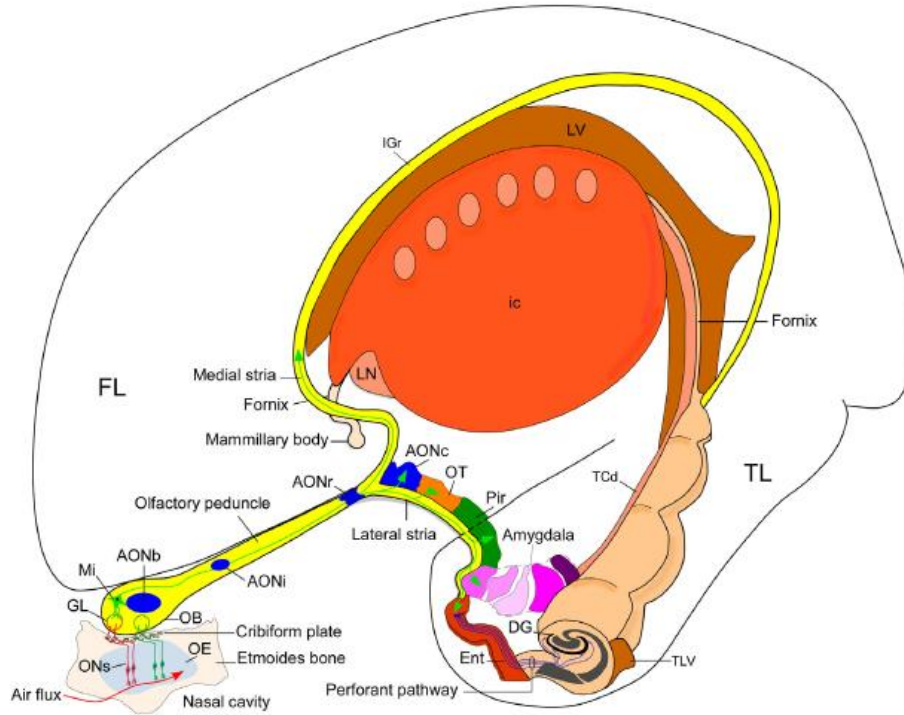


Ilustración 4 - Representación esquemática del sistema olfativo humano. Abreviaturas: AONb, núcleo olfatorio anterior (pars bulbar); AONc núcleo olfatorio anterior (pars cortical), AONi, núcleo olfatorio anterior (pars intrapeduncular); AONr, núcleo olfatorio anterior (pars retrobulbar); DG, circunvolución dentada; Ent, corteza entorrinal; FL, lóbulo frontal; GL, capa glomerular; ic, cápsula interna; IGr, indiseum griseum; NL, núcleo lenticular; LV, ventrículo lateral; Mi, célula mitral; OB, bulbo olfatorio; OE, epitelio olfatorio; ON, neuronas sensoriales olfatorias; OT, tubérculo olfatorio; Pir, corteza piriforme; TCd, cola del núcleo caudado; TL, lóbulo temporal; TLV, ventrículo lateral temporal. Se ha separado el hipocampo lateralmente de la amígdala y, las interacciones con la corteza entorrinal se modificaron topológicamente para mayor claridad (Saiz-Sanchez et al. 2016).

Dada la complejidad del sistema olfativo de roedores, para este trabajo nos focalizaremos en el bulbo olfatorio como estructura de entrada del estímulo olfativo y en la corteza piriforme por ser la estructura primariamente involucrada en el procesamiento de estos estímulos.

1.1.8 Disfunciones de la corteza prefrontal en las taupatías

Para complementar la investigación de la disfunción olfativa y la caracterización temprana de fenotipos en el modelo murino hTAU, en este trabajo analizamos las funciones relacionadas a la corteza prefrontal.

La corteza prefrontal (CPF) es considerada como el centro de cognición, está involucrada en el control ejecutivo de los procesos cognitivos de alto nivel como la memoria de trabajo que implica almacenamiento activo de la información y el procesamiento de esta, la toma de decisiones, el razonamiento y anticipación (Fuster 1997; Baddeley 1992; Jurado and Rosselli 2007). Daños o fallas en la CPF en humanos, conducen a la pérdida de memoria reciente o memoria de trabajo, hiperactividad, déficit de atención, modificaciones de la conducta social y alteración del proceso de inhibición interna (Luria 1964)

En varias taupatías existen alteraciones funcionales debido a la presencia de agregados neurofibrilares de tau que conllevan a síntomas clínicos como desinhibición, problemas de memoria asociativa o memoria de trabajo (Spillantini and Goedert 2013)

El modelo de ratón hTAU, a 12 meses de edad, desarrolla déficits de aprendizaje y memoria. Muestra déficits cognitivos en el reconocimiento de objetos y la memoria espacial, tareas de comportamiento que están asociadas con la función cortical e hipocampal (O'Keefe and Dostrovsky 1971; Morris et al. 1986; Tsien, Huerta and Tonegawa 1996; Winters et al. 2004), precisamente las regiones cerebrales afectadas por la patología tau (Polydoro et al. 2009)

1.1.9 Metabolismo de glucosa

Los avances en la tecnología de neuroimagen nos han permitido investigar en detalle la relación entre el metabolismo energético del cerebro y la aparición y progresión de la enfermedad del Alzheimer (EA). La tomografía por emisión de positrones (PET) que utiliza trazadores como ^{18}F fluorodesoxiglucosa (FDG) y el compuesto ^{11}C -Pittsbergh (PiB) se

ha convertido en el método in vivo más común y eficiente para medir el metabolismo energético cerebral (Chen and Zhong 2013)

Para las enfermedades neurodegenerativas, la técnica de PET se utiliza principalmente para detectar EA. Los pacientes con EA exhiben un hipometabolismo cerebral de la glucosa posiblemente debido a deficiencias en la señalización de la insulina y al metabolismo alterado de la tiamina (Chen and Zhong 2013)

Los estudios con FDG-PET en la EA han demostrado reducciones constantes y progresivas del metabolismo de la glucosa cerebral, cuya extensión y topografía se correlacionan con la gravedad de los síntomas (Mosconi 2005). En comparación con individuos de la misma edad, los pacientes con EA muestran deterioro regional del metabolismo de la glucosa en el lóbulo parieto-temporal, la corteza cingulada posterior y las áreas frontales durante la progresión de la enfermedad (Minoshima et al. 1997; Drubin, Caput and Kirschner 1984; Friedland et al. 1983)

Los cambios en el metabolismo de glucosa pueden estar relacionados a la alteración de varios parámetros fisiológicos. Entre ellos la muerte neuronal o la disfunción sináptica. En los análisis de PET la señal se emite cuando la FDG es captada por las células, por lo cual esta técnica permite detectar las diferencias en la captación de glucosa analizando comparativamente una determinada estructura en cerebros control o enfermos. Es importante destacar que estos valores siempre son comparativos, respecto de una condición control, de manera que una disminución en la captación de FDG indica un descenso en la actividad metabólica global de esa estructura cerebral.

En estudios previos en modelos animales se ha demostrado cambios significativos en estructuras afectadas por patología tau (Bouter and Bouter 2019).

2 Hipótesis y objetivos

Nuestra **hipótesis de trabajo** asume que la formación de especies tóxicas de Tau (por isoformas en exceso) en el cerebro adulto joven deriva en fenotipos tempranos conductuales, sensoriales, metabólicos y neuroquímicos que preceden a la formación de agregados y al déficit cognitivo.

El **objetivo general** de nuestro trabajo es la optimización de los modelos animales que se utilizan en el laboratorio para probar posibles estrategias terapéuticas experimentales, para lo cual es necesario caracterizar con mayor profundidad los fenotipos asociados a taupatías.

Como **objetivo específico** de este proyecto proponemos describir los fenotipos tempranos del modelo murino hTAU. En particular, estudiaremos la capacidad olfativa (potencial indicador temprano de patologías neurodegenerativas), complementando el estudio con ensayos comportamentales clásicos. Asimismo, nos proponemos identificar la disfunción metabólica y la presencia de tau patológica en los núcleos cerebrales que pudiesen estar implicados en el origen de los fenotipos en estudio.

3 Metodología

3.1 Lugar de trabajo

3.1.1 Laboratorio 222

Este estudio fue desarrollado en el Laboratorio de Terapéutica Experimental de los procesos neurodegenerativos, el cual se encuentra en el 3° (tercer) piso del INGEBI. Este espacio cuenta con las todas las instalaciones necesarias para los ensayos realizados en este trabajo. Allí se realizó la cría, mantenimiento, estudios comportamentales y posterior sacrificio de los ratones utilizados en este estudio, como así también la preparación de las muestras, las técnicas de PCR, Western Blot e inmunohistoquímica. Los estudios de imágenes fueron realizados en colaboración con el centro de imágenes moleculares del instituto FLENI¹.

¹ Entidad de bien público sin fines de lucro dedicada a la prevención, diagnóstico, asistencia e investigación de las enfermedades neurológicas.

3.1.2 Bioterio

Esta área se ubicada en el 1° (primer) subsuelo del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME). Se cuenta con espacios definidos y limitados donde se albergan y crían los animales, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, en condiciones apropiadas de luz, temperatura, humedad y con alimento y agua ad libitum. Este presenta salas con variedad de animales tales como ratones, ratas y hamsters.

Todos los procedimientos con animales se diseñaron de acuerdo con las pautas del NIH para el cuidado y uso de estos en el laboratorio. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, e INGEBI-CONICET.

En esta tesis de licenciatura se trabajó con ratones transgénicos. Estos se ubican en jaulas con una capacidad máxima de 5/6 animales o, en caso de maternidades, el ratón macho, la hembra y sus respectivas crías. Esto permite que los animales sean criados bajo estrictas barreras sanitarias, las cuales son monitoreadas periódicamente por personal especializado en el área.

Asimismo, se cuenta con 2 salas para efectuar cirugías, recorte de orejas/colas para la posterior genotificación, o cualquier otro tipo de manipulación que se deba llevar a cabo en los animales, y una sala de eutanasia con cámaras y tubos de CO₂.

3.1.3 Cuarto de comportamiento

El cuarto se ubica en el último piso del instituto. Es una sala destinada específicamente para el trabajo de animales fuera del bioterio, con acceso ad libitum a alimentos y agua, así como condiciones de luz, temperatura y humedad apropiadas. Se trabajó en horarios determinados para no perturbar el ciclo de luz/oscuridad de los ratones.

En esta sala se desarrollaron los test de comportamiento descriptos en la sección 3.2.3.

Al momento de trabajar se utilizó la vestimenta adecuada (guardapolvo y guantes) así como también las medidas sanitarias correspondientes.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Modelo de ratón

En este trabajo se manipularon ratones de la cepa C57BL/6, tanto silvestre (wild type, WT) como transgénicos (hTAU y KO). Para poder estudiar las consecuencias funcionales del desbalance de isoformas de Tau 3R y 4R en un modelo animal, en el laboratorio utilizamos el modelo de ratón hTAU (human Tau) validado previamente como un modelo de taupatía (Andorfer et al. 2003; Polydoro et al. 2009).

Los ratones transgénicos hTAU, cepa C57BL/6, se obtuvieron del Laboratorio Jackson². El ratón hTAU fue diseñado para expresar únicamente isoformas tau humanas (en contraste con el ratón salvaje que presenta en su estadio adulto únicamente la isoforma 4R), por lo tanto, expresa el gen humano *MAPT* normal y completo a partir de un cromosoma artificial PAC (P1 Artificial Chromosome) (Duff et al. 2000). Asimismo, estos ratones son mutantes nulos (knock out) para la proteína Tau murina, en el background de C57BL/6 (20 generaciones de retrocruza).

Este modelo tiene la particularidad de presentar un desbalance en el contenido relativo de isoformas de Tau 3R y 4R, presentando hasta dos veces un exceso de la isoforma 3R (Andorfer et al. 2003; Avale, Rodríguez-Martín and Gallo 2013), a diferencia de los ratones salvajes que producen mayoritariamente la isoforma 4R. El desbalance de isoformas de 3R y 4R ha sido propuesto en este modelo como el desencadenante de estos fenotipos.

Para generar las colonias de ratones, se retro-cruzaron hembras C57BL/6 del bioterio de FCEyN-UBA, por una cantidad determinada de generaciones, con dos machos fundadores obtenidos a partir del Laboratorio Jackson. De esta manera se obtuvieron ratones heterocigotas para la Tau murina y portadores del gen *MAPT* humano (en heterocigosis).

Por lo tanto, se obtuvieron colonias de diferente genotipo a partir de cruza entre estos ratones heterocigotas. En este trabajo de investigación se manipularon: ratones WT (como grupo control) y ratones hTAU (como grupo experimental).

² Bar Harbor, Maine, EE.UU.; B6.Cg-Maptm1 (EGFP) Klt Tg (MAPT) 8cPdav / J. Número de inventario: 005491

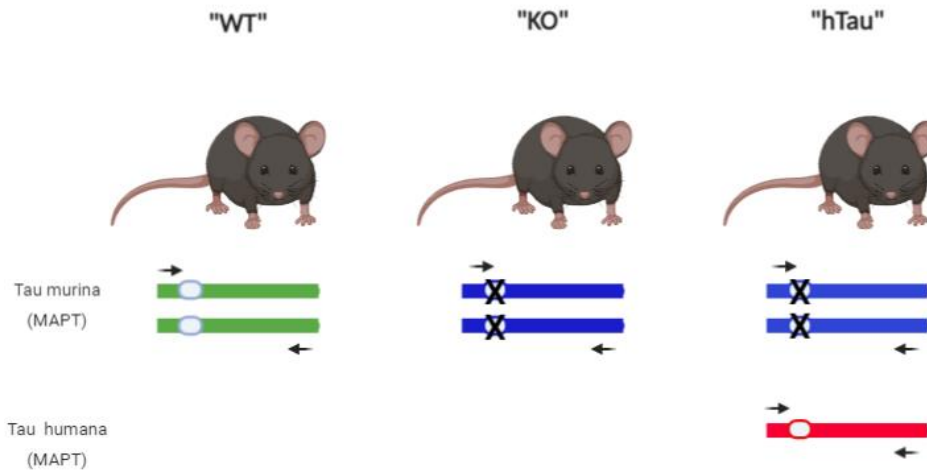


Ilustración 5 – Representación del modelo de ratón experimental utilizado en el trabajo de licenciatura.

3.2.2 Genotipificación de ratones transgénicos

Se utilizó la técnica PCR para confirmar el genotipo de los ratones donde se buscó el transgén MAPT humano y la detección nula del gen MAPT de ratón.

Para la obtención del material genético, se efectuaron biopsias de oreja de ratón en la sala de cirugía ubicada en el bioterio y la posterior digestión de estas con 100 µl de una solución de: buffer de lisis (50 mM Tris-HCL pH 7.5, 100 mM NaCl) junto con EDTA 0,5M (pH 8) y proteinasa K (Sigma-Aldrich P2308, 1/50) a 65°C en agitación overnight.

Una vez terminada la digestión, se prosiguió con la extracción y precipitación del ADN. Para esto, se agregaron 40 µl de acetato de potasio 5 mM y se dejó por 10 min en hielo para luego centrifugar por 20 min a 13.300 G conservando solamente el sobrenadante. Se agregaron 100 µl de alcohol isopropílico puro y se enfrió en hielo nuevamente por 10 min lo que permite ver la formación de dos fases. Nuevamente se centrifugó por 10 min a 13.300 G descartando esta vez el sobrenadante. Se le agregaron 100 µl de etanol 70% al pellet obtenido, centrifugando a la misma velocidad por 5 min. Conservando el pellet, se lo calentó a 80°C para evaporar el excedente de etanol. El ADN se resuspendió en 40 µl de H₂O RNAsa free por 30 minutos a 55°C.

Por último, se realizó la PCR por triplicado, utilizando los cebadores diseñados por Andorfer *et al.*, 2003 , para detectar:

- Presencia o ausencia del transgen humano *MAPT* primers (**hTAU**): IMR 3115 forward, IMR 3116 reverse. Las secuencias son: forward: 5'-ACTTTGAACCAGGATGGCTGAGCCC - 3' y reverso: 5'-CTGTGCATGGCTGTCCCTACCTT- 3');
- Presencia del alelo *MAPT* murino salvaje primers: IMR 3092 forward, IMR 3093 reverse. Las secuencias son: forward: 5'-CTCAGCATCCACCTGTAAC-3' y reverso: 5'-CCAGTTGTGTATGTCCACCC-3');
- El alelo *MAPT* murino salvaje interrumpido (*knock out*, **KO**) primers: IMR 1416 forward, IMR 8072 reverse. Las secuencias son: forward: 5'-CAGGCTTTGAACCAGTATGG-3' y reverso: 5'-TGAACTTGTGGCCGTTTACG 3').

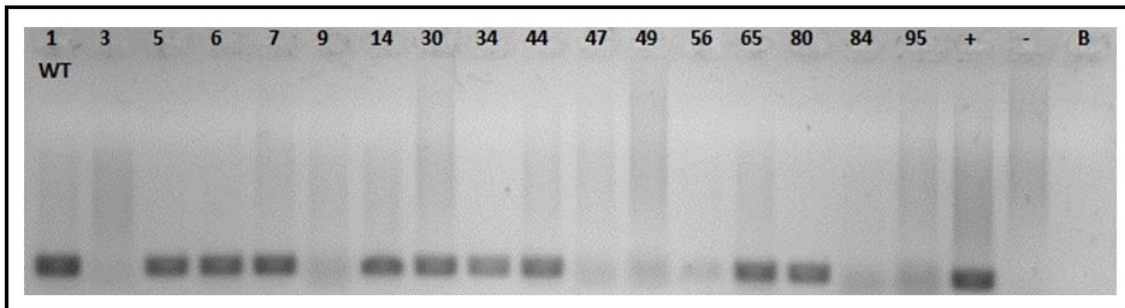


Figura 1 – PCR punto final. Genotificación para confirmar la identidad WT de las muestras analizadas. Se detecta la presencia del alelo *MAPT* murino salvaje. Control positivo: muestra de ratón WT; Control negativo: muestra de ratón hTAU.

En el caso del gel de la figura 1, podemos asegurar que los animales n° 3, 7, 14, 30, 44, 47, 49, 65 y 95 son WT.

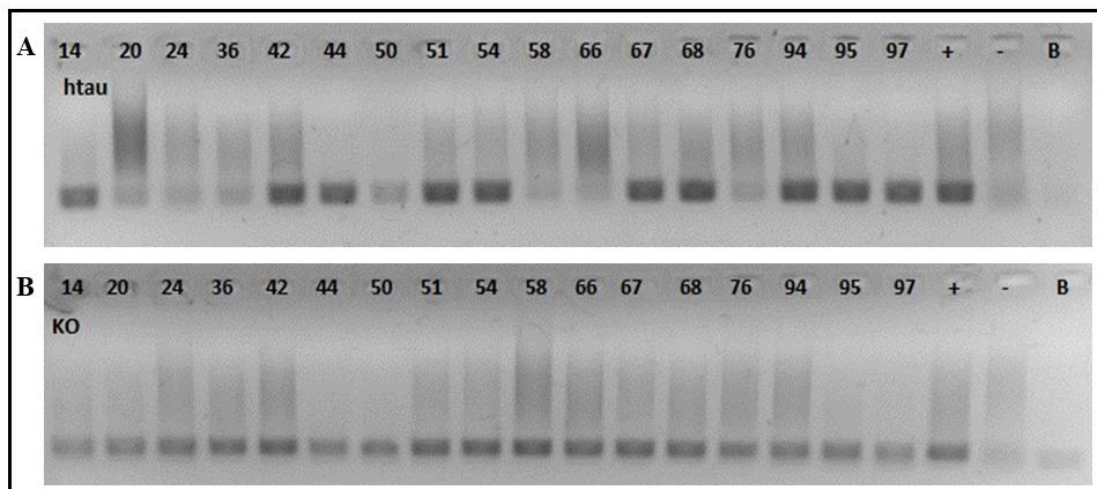


Figura 2 - PCR punto final para identificación de ratones hTAU. (A) Genotificación para confirmar la identidad hTAU de las muestras analizadas. Se detecta presencia o ausencia del transgen humano MAPT. Control positivo: muestra de ratón hTAU; Control negativo: muestra de ratón WT. (B) Genotificación para confirmar la identidad KO de las muestras analizadas. Se detecta el alelo MAPT murino salvaje interrumpido. Control positivo: muestra de ratón KO; Control negativo: muestra de ratón WT.

Al momento de analizar los geles, se observó: para los ratones WT, una banda positiva representando el MAPT de ratón; para los ratones hTAU, bandas positivas para MAPT humana (hTAU) y alelo knock out del MAPT murino (KO).

Siendo que el MAPT humano en el ratón hTAU no se segrega mendelianamente, algunos ratones de la colonia hTAU presentaron genotipo positivo para KO pero no para MAPT humana. A este grupo de animales se los identificaba como KO, knock out.

En el caso del gel de la figura 2, podemos asegurar que los animales nº 20, 24, 36, 42, 51, 54, 58, 66, 94 son hTAU.

3.2.3 Ensayos comportamentales

3.2.3.1 *Reconocimiento de objeto novedoso (NOR; Novel Object Recognition)*

La prueba de reconocimiento del objeto novedoso (NOR, por sus siglas en inglés) nos permitió evaluar el rendimiento cognitivo y memoria. Una tarea que depende de la integridad de la corteza prefrontal (Morici, Bekinschtein and Weisstaub 2015), la cual se encuentra severamente afectada en ratones hTAU adultos (Castillo-Carranza et al. 2014; Polydoro et al. 2009). Los ratones tienen una preferencia innata por objetos novedosos, por lo cual se evalúa la memoria de objetos que se les han presentado en el pasado, los llamados objetos familiares.

El procedimiento cuenta de tres etapas. La primer etapa consistió en habituar a los animales a la cámara (30x23x25cm) donde se realizó el ensayo comportamental completo. En la habituación el ratón se ubica en la cámara sin ningún objeto y por una duración de 10 minutos (por animal). En la segunda etapa, se colocó al ratón en la cámara durante 10 minutos, pero esta vez en presencia de dos objetos completamente iguales que se encuentran en lados opuestos de la cámara. En esta etapa se entrena al ratón para que reconozca a los objetos y los memorice como objetos familiares. Como objetos se usaron torres de ladrillos plásticos construidos con Legos y frascos de cultivo celular T25 rellenos con arena, ambos con tamaños similares. Entre la segunda y tercer etapa hay un periodo de 3 horas de retraso. Luego de transcurrido ese tiempo, se volvió a colocar al ratón en la cámara. En esta etapa la cámara posee dos objetos en las mismas posiciones que en el entrenamiento con la diferencia que uno de los objetos fue reemplazado por otro completamente diferente (en forma, textura y color), el objeto novedoso.

La última etapa es el periodo donde el ratón está a prueba. Durante este ensayo se le permite al ratón explorar por un periodo de 3 minutos los objetos en la cámara. El periodo de exploración se grabó para poder analizar posteriormente el tiempo dedicado a cada objeto.



Ilustración 6 - Bosquejo del protocolo realizado en el ensayo de reconocimiento del objeto novedoso.

Para eliminar el sesgo de posiciones y preferencia por los objetos, se modificaron las posiciones y tipo de objeto novedosos y del objeto familiar en los diferentes grupos de ratones de manera aleatoria.

El ensayo permite comparar índices de discriminación (ID) entre grupos, que representan el tiempo de exploración del objeto novedoso sobre el familiar.

3.2.3.2 Laberinto en cruz elevado (*plus-maze*)

Esta prueba, se realizó como se describe en el protocolo utilizado anteriormente por el grupo de investigación (Avale et al. 2004) . Este ensayo permite analizar fenotipos de ansiedad y desinhibición.

Se colocó al ratón en un laberinto en cruz elevado, tal como su nombre lo indica, por un periodo de 3 minutos. Este laberinto cuenta con dos de sus brazos abiertos (sin paredes, es una pasarela abierta) y dos de sus brazos cerrados (con paredes de 10 cm, completamente negras). De esta manera se evaluó, mediante el uso de una cámara que grabó todo el experimento, el tiempo de exploración total tanto de los brazos abiertos como cerrados y la cantidad de entradas en cada espacio. Mayores tiempos y entradas a brazos abiertos, indican una mayor desinhibición de los ratones, dada su aversión natural a espacios abiertos que presentarían un mayor riesgo para el animal.

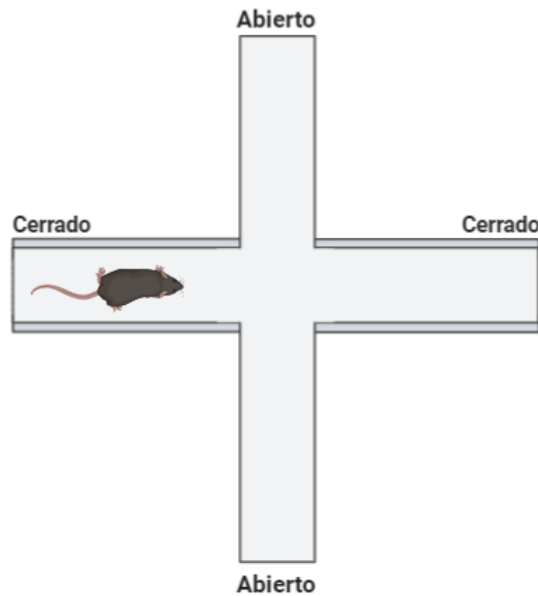


Ilustración 7 – Bosquejo del laberinto en cruz elevado utilizado para el protocolo mencionado anteriormente.

3.2.3.3 Enterramiento de canicas (*Marble burying*)

Este ensayo se realizó para evaluar el comportamiento de enterramiento que depende en gran parte de la corteza prefrontal. Se prepararon jaulas individuales con canicas situadas por encima del marlo sin hacer presión. Se preparó un piso de marlo de aproximadamente 2-3cm de altura para que el ratón pueda enterrar cómodamente la canica. Se colocaron 10 canicas de

vidrio en la jaula de cada ratón y se estimó el porcentaje de canicas enterradas al cabo de 30 minutos.

3.2.3.4 *Ensayo de anidamiento (Nesting)*

Los ratones fueron evaluados en su capacidad de preparar un nido a partir de algodón prensado. Se colocaron en jaulas aisladas y se colocó un bloque de algodón prensado (tampón) previamente pesado. Se dejó actuar al ratón durante la noche ya que es su periodo de mayor actividad. Al día siguiente se pesó el algodón en forma de nido y el no utilizado por separado. Se evaluó, además, en una escala de puntuación del anidamiento del 1 al 5 (siendo 5 un nido perfecto y 1 el algodón prensado completamente intacto) el estado del nido construido.

Esto nos permite comparar comportamientos innatos del ratón que pueden verse afectados por la patología siendo un indicador de la función de la corteza prefrontal.

3.2.3.5 *Laberinto de agua (Morris Water Maze)*

El laberinto de agua de Morris (MWM) es una prueba de aprendizaje espacial para roedores que se basa en señales distales para navegar desde ubicaciones de inicio alrededor del perímetro de una arena de natación abierta para ubicar una plataforma de escape sumergida. Este ensayo ha demostrado ser una prueba sólida y confiable que está fuertemente correlacionada con la plasticidad sináptica del hipocampo y la función del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Vorhees and Williams 2006).

Se colocó al ratón en una pileta circular de aproximadamente 1 metro de diámetro. La pileta se encuentra llena de agua coloreada (con pintura blanca, no tóxica) a 27 ° C y dividida en 4 cuadrantes. El agua debe colorearse para que el ratón no pueda visualizar la plataforma. Dentro de la pileta se encuentra oculta la plataforma que el ratón buscará para poder descansar y dejar de nadar. En cada cuadrante se colocó un distintivo visual como referencia espacial. La plataforma de escape oculta bajo el agua (15 cm) se colocó en el centro de uno de los cuadrantes. Esta se encuentra siempre de manera fija en el mismo cuadrante.

Se realizó un entrenamiento de 3 días de aprendizaje y un ensayo final de evaluación en el último día. Durante el entrenamiento, el animal se sometió a dos bloques de seis ensayos en total (de 60 segundos cada uno) con un intervalo de 10 minutos entre estos. Una vez transcurridos los 60 segundos del ensayo, se arrima al ratón a la plataforma en caso de no haberla encontrado y se lo deja reposar allí durante 30 segundos para que pueda reconocer los

patrones visuales. Durante la prueba realizada el día 3, luego de todo el entrenamiento, no se colocó la plataforma en la pileta. La prueba tiene una duración máxima de 120 segundos para que el animal pueda encontrar la plataforma.

Lo que se analizó fue la cantidad de veces y el tiempo que los ratones pasaban por el cuadrante donde estaba ubicada la plataforma durante el entrenamiento.

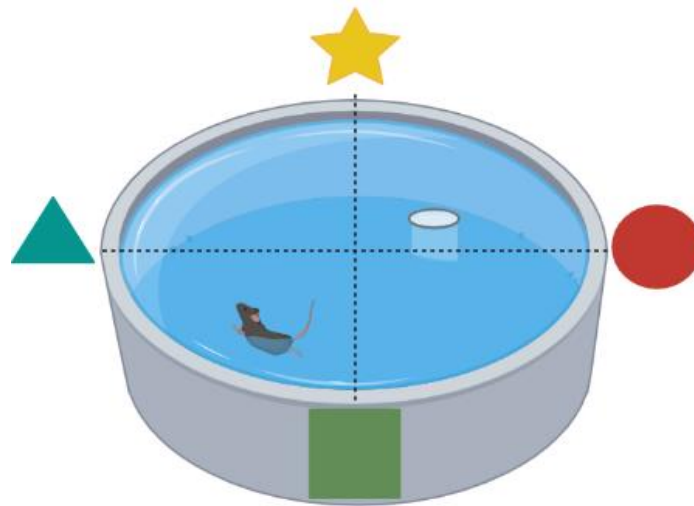


Ilustración 8 - Bosquejo del laberinto de agua.

3.2.3.6 Ensayos de olfacción

Los ensayos relacionados con la respuesta innata a los olores se realizaron siguiendo protocolos previamente utilizados por un grupo colaborador en París (Lazarini et al. 2014). Se evaluó la respuesta innata a ciertos olores previamente descritos como neutros, aversivos (p. Ej., olor de un depredador) o apetitivos (p. Ej., olor a orina hembra en ratones macho o comida). Esta prueba nos permite evaluar la respuesta hedónica a los olores.

Por otro lado, se realizaron pruebas de discriminación de olores motivadas por la recompensa. Los animales fueron entrenados en un protocolo diseñado por un grupo colaborador (Alonso et al. 2006; 2012; Grelat et al. 2018). Este ensayo nos permite estudiar la función olfativa mediante tareas de diferente dificultad en función de los pares de olores o mezclas de olores utilizados. Además, podemos evaluar el umbral de detección de olores y memoria olfativa.

Puesta a punto

Se realizaron ensayos de respuesta innata a los olores y de memoria olfativa siguiendo protocolos descritos por la Dra. Mariana Alonso ³ (Alonso et al. 2006; Grelat et al. 2018).

En este trabajo de licenciatura primero se puso a punto la técnica de respuesta innata a los olores y discriminación de olores motivada por recompensa en animales WT para luego poder ensayar con el modelo animal hTAU.

Primera etapa: respuesta innata a los olores. Se sometió a los animales a un entrenamiento donde se les presentaron, en diferentes oportunidades, recipientes con olores que son neutros o apetitosos: agua, vainilla (1:5000), coco (1:5000) y social (olor obtenido del lecho de jaula de ratones hembra). Cada animal fue expuesto 5 minutos a cada olor y se cronometró el tiempo de exploración del recipiente. Esto se repitió 3 veces por ratón, por aroma. Los animales se encontraban previamente habituados al espacio donde se realizó el ensayo.

Segunda etapa: discriminación olfativa mediada por recompensa. Los animales fueron entrenados para diferenciar dos aromas que le son apetitosos (coco y vainilla) para conseguir una recompensa (semilla de girasol). Para esto los ratones fueron parcialmente privados de alimento (85% del consumo inicial) y luego fueron sometidos a 5 sesiones de pre-entrenamiento exponiéndose a dos compartimentos con olores diferentes, en uno de los cuales estaba la recompensa, para que fuese asociada aleatoriamente a uno de los dos olores. En nuestro caso, seleccionamos la vainilla como aroma candidato para asociar a la recompensa. Se les dio a los ratones un tiempo máximo de 60 segundos para encontrar la recompensa. En caso de no hallarla, en ese lapso de tiempo, se le acercó el recipiente con la semilla para que pudiese asociar el aroma con la recompensa. Esto se repitió 5 veces por ratón durante 2 días. Finalizado el segundo día de entrenamiento, se realizó un ensayo para determinar la asociación de la recompensa al olor. En este caso, no se encontraba la recompensa en ninguno de los dos recipientes. De esta manera se puede evaluar la insistencia a explorar el olor que está asociado a la recompensa.

Las etapas de la puesta a punto del protocolo se realizaron en una primera instancia en ratones macho WT (n=7; edad 5 meses). En una segunda instancia, se aplicó el mismo protocolo

³ Laboratorio de Percepción y Memoria, Instituto Pasteur, Paris

a una cohorte nueva de ratones, que esta vez incluía al ratón hTAU (WT: n=7; edad 5 meses; hTAU: n=6; edad 4 a 6 meses). Posteriormente, se ensayó en animales tanto macho como hembra (machos: WT, n=9, edad 6 meses; hTAU, n=6, edad 6 meses; hembras: WT, n=3, edad 6 meses; hTAU, n=3, edad 6 meses).

Ensayo de discriminación olfativa

La cohorte de ratones WT (n=7; edad: 6 meses) y hTAU (n=6; edad: 5 a 7 meses) utilizados en la puesta a punto se sometieron a un protocolo de discriminación de olores (*discrimination protocol*). En este caso se colocaron las esencias de coco y vainilla combinadas (Ver tabla 1), en diferentes porcentajes, a una concentración de 1:5000 ambas esencias, hasta llegar a un porcentaje 50% - 50% de ambas. Se analizó el tiempo que tardaba cada ratón en llegar hasta el recipiente con mayor porcentaje de aroma vainilla. En el caso del último trial, el ratón se encuentra con el dilema de que ambos recipientes poseen el mismo aroma.

Recipiente 1		Recipiente 2	
Vainilla	Coco	Vainilla	Coco
100%	0%	0%	100%
80%	20%	20%	80%
65%	35%	35%	65%
50%	50%	50%	50%

Tabla 1 – Combinación de esencias para el protocolo de discriminación olfativa: coco (1:5000) y vainilla (1:5000). Se combinan las esencias en diferentes porcentajes hasta llegar a un 50% de cada una por recipiente.

Finalmente, se ensayó un protocolo de motivación por recompensa donde se encontraba la semilla escondida de manera aleatoria en alguna de las cuatro esquinas de la caja donde se ubicó a los ratones. En este caso, no se asoció ningún aroma con la ubicación de la recompensa. De esta manera evaluamos si podían percibir el olor de la semilla por sí sola. Atribuimos la búsqueda, entonces, al propio olor emanado por la semilla de girasol. El resto del protocolo utilizado es el mismo que se mencionó anteriormente.

3.2.4 PET: tomografía por emisión de positrones para animales de laboratorio

La tomografía por emisión de positrones (PET) es una de las modalidades de obtención de imágenes que se está desarrollando para la obtención de imágenes de animales pequeños *in vivo*. La PET proporciona imágenes que muestran la distribución tridimensional de trazadores marcados radiactivamente en un sujeto vivo de forma no invasiva. Combinado con imágenes

tomográficas dinámicas y modelos cinéticos de trazadores, la PET proporciona mediciones cuantitativas del curso temporal de biomoléculas en sujetos vivos (Phelps 2000; Cherry and Gambhir 2001).

Se puede utilizar para medir de forma no invasiva la presencia y concentración de isótopos emisores de positrones en individuos vivos. Se administran de manera sistémica (intravenosa) sondas marcadas con alta actividad radioquímica específica con radionucleidos emisores de positrones que se retienen en los tejidos como resultado de la unión de un ligando emisor de positrones a un receptor apropiado o de la conversión de un sustrato enzimático emisor de positrones en un 'producto'. Las sondas de PET se utilizan generalmente en concentraciones picomolares a nanomolares, varios órdenes de magnitud por debajo de los niveles farmacológicos. La entrada de la sonda en el tejido, la eliminación de la sonda del tejido y la retención dependiente del receptor o de la enzima de la sonda emisora de positrones en el tejido se detectan con el escáner PET. La retención de compuestos emisores de positrones se puede controlar de forma no invasiva, repetitiva y cuantitativa en individuos vivos. Por lo tanto, el PET se puede utilizar para monitorear procesos como reacciones enzimáticas, interacciones ligando-receptor, metabolismo celular, proliferación celular y migración celular (Herschman 2003).

Micro-PET es el escáner PET comercial de pequeños animales, desarrollado recientemente, que se ha convertido en la plataforma actual para los estudios que ahora se llevan a cabo utilizando modelos murinos (Tai et al. 2001)

Para poder analizar el Micro-PET se utiliza FDG (fluorodeoxiglucosa-¹⁸F). Este marcador se ha utilizado para evaluar las alteraciones del metabolismo de la glucosa en el cerebro como en la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos del sistema nervioso central, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades infecciosas, autoinmunes e inflamatorias (M E Phelps 2000). FDG, como análogo de la glucosa, es captado por células que usan mucha glucosa, como el cerebro, los adipocitos marrones, los riñones y las células cancerosas, donde la fosforilación evita que la glucosa se libere nuevamente de la célula, una vez que ha sido absorbido. De esta manera, esta marcación permite analizar la actividad cerebral *in vivo* ya que se localiza en tejidos metabólicamente activos y se acumula como un compuesto radiomarcado de manera dependiente de la actividad.

Para realizar este ensayo, los animales se privaron de alimento durante 4 hs. Luego se inyectaron con 25 μCi / gr de ^{18}F -FDG y se dejó sin tocar en una jaula individual con temperatura controlada (29 ° C) durante 30 min durante la incorporación del radiofármaco. A continuación, los ratones se anestesiaron usando una mezcla de isoflurano y O₂ (inhalación, inducción al 4,5% y dosis de mantenimiento al 1,5%) y se mantuvieron en una mesa caliente (35°C).

Las imágenes se adquirieron utilizando un PET TriFoil Lab-PET 4 preclínico (3,75 cm de longitud axial) con doble capa de cristales de LYSO y GSO, ensamblados en pares de foswich. La lectura de la señal se basa en una detección de APD (fotodiodo de avalancha)⁴. La reconstrucción de la imagen se realizó sobre los datos de emisión a través de la reconstrucción iterativa 3D-OSEM (maximización de la expectativa de subconjunto ordenado) (30 iteraciones). Todas las imágenes se registraron conjuntamente y se normalizaron a una plantilla ^{18}F -FDG.

Todos los grupos se analizaron como una prueba *t* de student, usando SPM12. La normalización de la intensidad se consideró como una variable regresora para cada factor utilizando la escala media de todos los cerebros (ANCOVA).

Este ensayo fue realizado en colaboración con el Laboratorio de Imágenes Moleculares del instituto FLENI (Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia).

3.2.5 Obtención de cerebro fijado por perfusión cardiaca.

Se anestesió a los ratones con ketamina/xylacina en una dosis de 35 mg/kg + 5 mg/kg, respectivamente. Se los colocó en una superficie plana donde se los sujetó desde las extremidades y se procedió con las incisiones e inyecciones de fijador (paraformaldehído al 4% O.N.), como se muestra en la ilustración 9, mediante el uso de una bomba peristáltica.

⁴ Fotodetectores que se pueden considerar como el equivalente semiconductor de los fotomultiplicadores. Aplicando un alto voltaje en inversa, muestran un efecto interno de ganancia de corriente debido a la ionización de impacto.

Luego se llevó a cabo la disección, el cerebro fue sumergido en 15 ml de PFA 4% por 24 horas y posteriormente, crio protegido con concentraciones crecientes de sacarosa en PBS 0.1 M 10% el primer día, 20 % al segundo y finalmente conservado en sacarosa 30%. Se obtuvieron secciones de 50uM en vibrátomo (Leica).

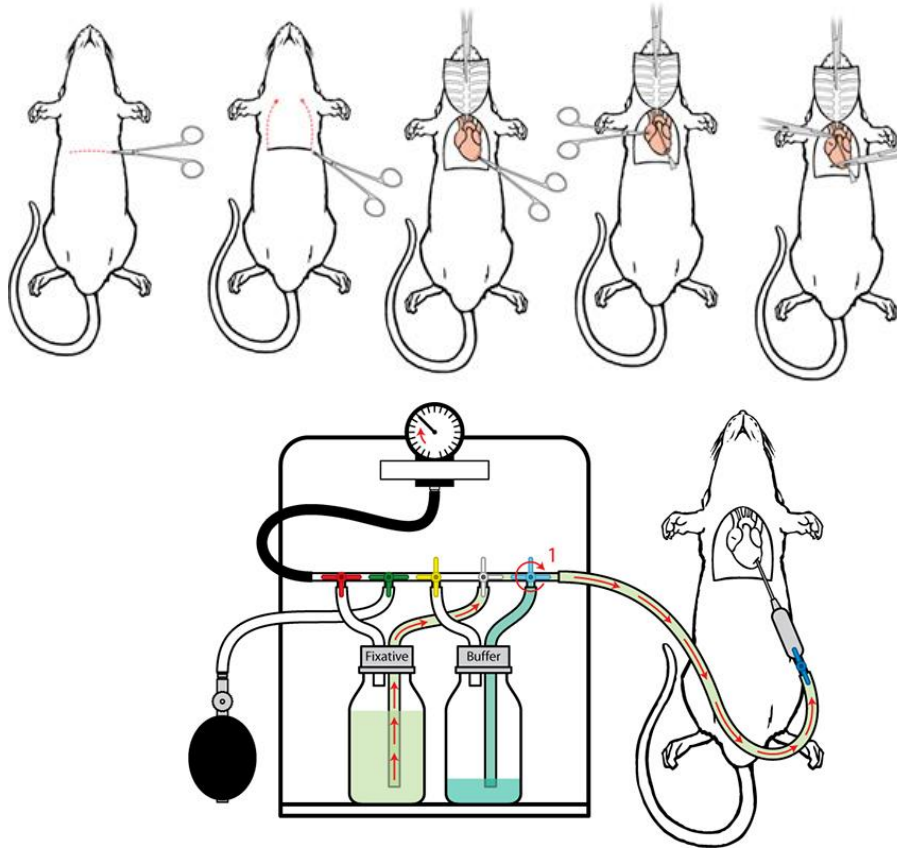


Ilustración 9 - Representación ilustrativa del procedimiento quirúrgico de la perfusión cardiaca. (Gage, Kipke and Shain 2012).

3.2.6 **Imunohistoquímica: reactivos y protocolo**

Se realizó la técnica inmunohistoquímica para marcar la formación de agregados de tau en regiones específicas del cerebro. Se utilizó un anticuerpo específico contra las formas de tau con hiperfosforilación patológica tardía en T231/S235 (anticuerpo AT-180) en ratones hTAU.

Se recogieron secciones seriadas coronales del cerebro de ratones hTAU de 6 a 8 meses. Las regiones seleccionadas para detectar los agregados son el bulbo olfatorio, hipocampo y corteza prefrontal (PFC). Ratones WT fueron utilizados como control negativo.

Se incubaron los cortes individualmente en una solución de antigen retrieval (tris-EDTA buffer, 10 mM Tris base, 1 mM solución EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9.0) durante 4 a 5 minutos a una temperatura de 99°C en agitación leve. Esto permite aumentar la detectabilidad de las proteínas dado que el proceso de fijación de la muestra puede producir enmascaramiento de los antígenos y puede restringir la unión del antígeno-anticuerpo. Se dejó reposar a los cortes *overnight* en buffer PBS.

A continuación, se llevó adelante el bloqueo inespecífico del tejido con suero de cabra (normal goat serum, NGS) al 2% en PBS-T 0,15% y se utilizó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua al 0,3% para el bloqueo de peroxidasas endógenas. Ambos bloqueos se realizaron en simultaneo durante 90 minutos a temperatura ambiente. Luego se incubó *overnight* a 4 ° C (cámara fría) con el anticuerpo monoclonal AT-180 (1:1000, NGS 2%, PBS-T 0,15%) que reconoce la proteína tau hiperfosforilada en T231/S235.

Al día siguiente se lavaron los cortes con PBS-T 0,15% en agitación (3 lavados de 10 minutos) y se incubó con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón biotinilado (1:500, NGS 2%, PBS-T 0,15%) a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente se efectuó la última incubación de los cortes con el complejo streptavidina-peroxidasa (strep-HRP) durante 1 hora, seguido del revelado con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) combinado con H₂O₂ al 50%. Se detuvo la reacción inmediatamente con PBS.

Los cortes se montaron en portaobjetos cuidadosamente y se deshidrataron con volúmenes crecientes de alcohol (30% al 100%) y finalmente, con xileno. Se utilizó DPX (Sigma-Aldrich) como medio de montaje.

Las marcas fueron examinadas bajo microscopio (Leica) acoplado a una computadora de escritorio y una cámara fotográfica que permiten la captura de imágenes.

3.2.7 Western blot: reactivos y protocolo

Para obtener las muestras a analizar se realizó la extracción de proteínas de bulbos olfatorios. Las muestras se almacenaron a – 80 ° C para prevenir cualquier tipo de degradación. Al momento de utilizarlas se mantuvieron en hielo.

La extracción consta de una solución 1:100 de inhibidor de proteasas y fosfatasa en un buffer de homogeneización (Tris-HCl mM, NaCl 150 mM, Triton X 1%, SDS 0,05%, EDTA 2

mM, pH 7,5). Al tubo centrífuga que contenía las muestras de tejido murino se le agregaron 100ul de la solución y con ayuda de una jeringa se fue disgregando. Luego se centrifugó a 4 °C por 15 minutos a 13.000 RPM.

Se tomó el sobrenadante y se midió con una micropipeta de 200ul cuanto volumen de muestra se obtuvo para luego poder calcular el volumen de cracking buffer correspondiente para cada muestra (20 μ l de buffer de lisis de proteínas junto con 0,1% de cracking buffer 5X + 0,1% de β -mercaptoetanol).

Se cuantificó la cantidad de proteína obtenida a partir del KIT BCA de Thermo Scientific⁵. Se preparó una curva de BSA (albúmina sérica bovina) a partir de una solución madre (2 μ g/ml) y se hicieron diluciones seriadas al medio con buffer de homogeneización. Los puntos de la curva (ng/ μ l) son: 2000 - 1000 - 500 - 250 - 125 - 62,5 y blanco (agua destilada). Luego a cada dilución de la curva y a las muestras se le agregaron los reactivos A y B tal como lo indica el protocolo del proveedor. Se utilizó una placa multi-pocillo de 96 donde se sembró la muestra, por duplicado, y la curva de BSA, por simplificado. En cada pocillo se sembraron 25ul. Se utilizó un lector de ELISA para cuantificar.

Luego de la cuantificación se realizó la desnaturalización de las proteínas de las muestras. Se calentaron los tubos a 99 ° C por 10 minutos con la adición de la solución de crackeo previamente calculada. Posteriormente se centrifugaron por 5 minutos a máxima velocidad para liberar el sobrenadante de impurezas.

Se sembraron cantidades específicas de cada muestra, según la cuantificación de proteínas, y el marker (See Blue Plus). Los dos geles utilizados para una corrida son de 0,75mm de acrilamida 12% formado por dos partes: en la parte superior el gel de stacking (apilado) y en la parte inferior, el gel de running (corrida). La composición de los geles es la siguiente:

- Gel de running (corrida) 12%: H₂O, Acrilamida filtrada, Tris 1,5 M (pH 8.8), SDS 10%, APS 10% y TEMED.
- Gel de stacking (apilado) 12%: H₂O, Acrilamida filtrada, Tris 1 M (pH 6.8), SDS 10%, APS 10% y TEMED.

⁵ Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Catalog Numbers 23225 and 23227.

Los geles se colocaron en una cuba electroforética, agregando running buffer (Glicina, Tris Base y SDS). Se corrió por 120 minutos a 90 V.

Inmediatamente posterior a la corrida, se realizó la transferencia tipo *semi-dry* utilizando dos membranas de nitrocelulosa (BioRad) 0,22 μm , junto con esponjas Whatman (BioRad). Se activaron las membranas colocándolas 30 segundos en agua destilada a 50 ° C y luego 15 minutos en buffer de transferencia (80%: Tris y Glicina; 20%: Metanol). Se realizó la transferencia sobre la cuba colocando primero una esponja apenas embebida en buffer de transferencia, segundo se colocó la membrana activada, tercero el gel de acrilamida y en cuarto lugar se colocó otra esponja embebida en buffer de transferencia. Se corrió durante 30 minutos a 15V.

Para verificar que la corrida fue satisfactoria, luego de la transferencia se lavaron las membranas con TBS-T (por las siglas en inglés, Tris Buffered-Saline with Tween 20) y se incubaron las membranas por 10 minutos en solución Ponceau S. Prontamente se lavó con TBS-T.

Las membranas se bloquearon con leche en polvo descremada o BSA al 5% en TBS-T, con agitación constante durante 90 o 120 minutos, correspondientemente. La diferencia de tiempo de bloqueo se debió a que el BSA tiene menor efecto bloqueante. Seguidamente se incubó con el anticuerpo anti-Actina-HRP⁶ en TBS-T con leche o BSA al 0,5% según correspondiera, *overnight* a 4 ° C (en cámara fría). Al día siguiente, se realizaron los lavados correspondientes y se revelaron las membranas con ECL (luminol + peroxidasa, ThermoFisher) en el equipo Gene Gnome XRQ (Syngene) detector de quimioluminiscencia.

Las mismas membranas se dejaron incubando *overnight* a 4 ° C (en cámara fría) con el anticuerpo primario correspondiente a cada una.

En este trabajo se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: AT-180⁷ (previamente utilizado en la inmunohistoquímica) en BSA al 0,5% + TBS-T 0,1% y anti-Tau total⁸ en leche al 0,5% + TBS-T 0,1%. Al día siguiente, se realizaron los lavados correspondientes y se incubó

⁶ Monoclonal de ratón (1:25000, ThermoFisher).

⁷ Monoclonal (1:1000, ThermoFisher). Detecta Thr231.

⁸ Policlonal de conejo (1:10000; Dako, Dinamarca).

a cada membrana con anticuerpo secundario anti-mouse/anti-rabbit ⁹ según correspondiera en leche o BSA al 0,5% + TBS-T 0,1% por 120 minutos a temperatura ambiente. Se quitó el excedente con diferentes lavados y se reveló la membrana con ECL (como se mencionó anteriormente).

A partir de las imágenes se procedió a la cuantificación de la intensidad de luminiscencia. En todos los casos relativizando a los niveles de densidad óptica de la proteína actina (control de carga en la misma membrana y corrida).

4 Resultados

4.1.1 Ensayos de comportamiento

Se realizó un estudio de diferentes aspectos de la conducta de los ratones hTAU, focalizando en aquellos comportamientos que se encuentran directa o indirectamente regulados por la corteza prefrontal, hipocampo y bulbo olfatorio. Se analizaron ratones de los grupos experimentales hTAU y WT (control) a los 6-9 meses de edad. Posteriormente se seleccionaron algunos de estos ensayos y se llevaron a cabo en una nueva cohorte de animales WT y hTAU, a partir de los 3 meses de edad.

4.1.1.1 *Reconocimiento de objeto novedoso (NOR)*

Los ratones fueron evaluados en el ensayo de reconocimiento del objeto novedoso (NOR), como una evaluación del rendimiento cognitivo a la edad de 6-9 meses.

A los 6-9 meses de edad los ratones hTAU mostraron un índice de discriminación significativamente menor que los ratones WT (control) (p valor < 0,01 prueba *t* de student no apareado) (gráfico 1A). Este resultado es consistente con reportes previos en este modelo (Polydoro et al. 2009; Espíndola et al. 2018).

⁹ Policlonal (1:2000, Cell Signaling)

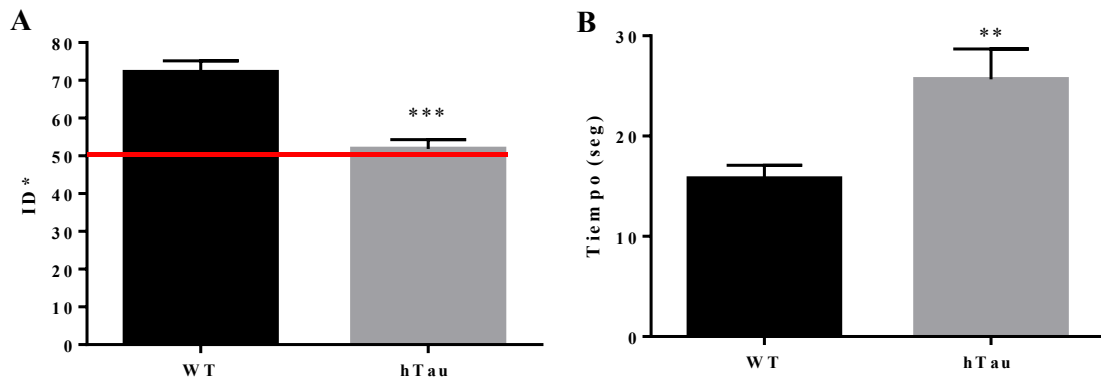


Gráfico 1 – (A) Índice de discriminación del objeto novedoso (ID*), calculada como el tiempo dedicado a explorar el objeto nuevo dividido por el tiempo total dedicado a explorar ambos objetos (p valor < 0,01 prueba *t* de student no apareado). (B) Tiempo total de exploración (p valor < 0,01 prueba *t* de student no apareado). WT, n = 11, edad 7- 8 meses; hTAU, n = 8, edad 7 meses.

Además se comparó el tiempo total de explotación entre los grupos (gráfico 1B), observándose diferencias en los niveles totales de exploración. Los ratones hTAU mostraron un comportamiento de exploración más alto (p valor < 0,01 prueba *t* de student no apareado).

Con el objetivo de explorar fenotipos más tempranos en el modelo murino hTAU, se realizó este mismo protocolo en animales de 3 meses de edad.

Los resultados obtenidos mostraron un índice de exploración del objeto novedoso alrededor del 50% para los animales hTAU, es un rendimiento bajo de discriminación comparado con los ratones WT del 62 % (gráfico 2A).

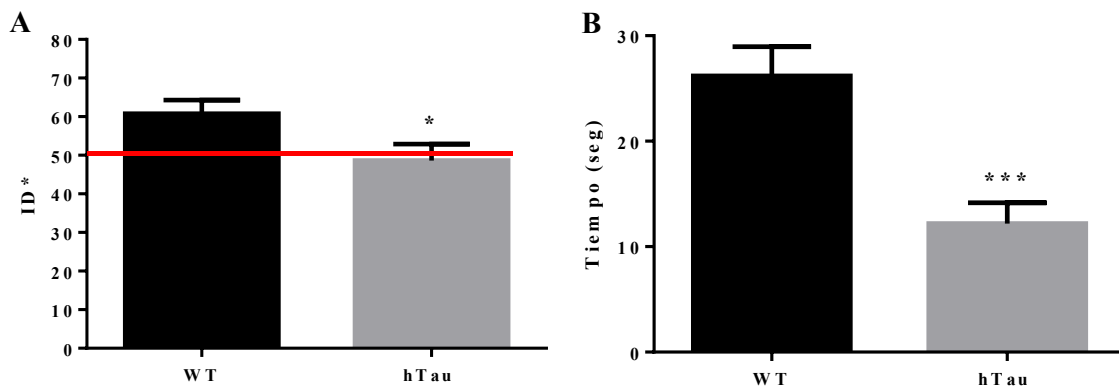


Gráfico 2 - (A) Índice de discriminación del objeto novedoso (ID*), calculada como el tiempo dedicado a explorar el objeto nuevo dividido por el tiempo total dedicado a explorar ambos objetos (p valor 0,0384, prueba *t* de student para datos no apareados). (B) Tiempo total de exploración (p valor < 0,01, prueba *t* de student para datos no apareados). WT, n = 17; hTAU, n = 15; edad 3 meses.

Por otro lado, en el caso de estos ratones jóvenes, el tiempo de exploración entre los 2 grupos tampoco es similar, aumentando el tiempo de exploración por parte de los ratones WT

(gráfico 2B). Esto se podría deber a una falta de interés por el objeto novedoso utilizado o una desmotivación por la exploración.

4.1.1.2 Laberinto en cruz elevado (*Plus Maze*)

El ensayo del laberinto en cruz elevado es un test que permite cuantificar los niveles de ansiedad en los animales determinando su actividad en los brazos abiertos respecto de los brazos cerrados. Es un ensayo comportamental utilizado para analizar conductas de inhibición/desinhibición en modelos murinos .

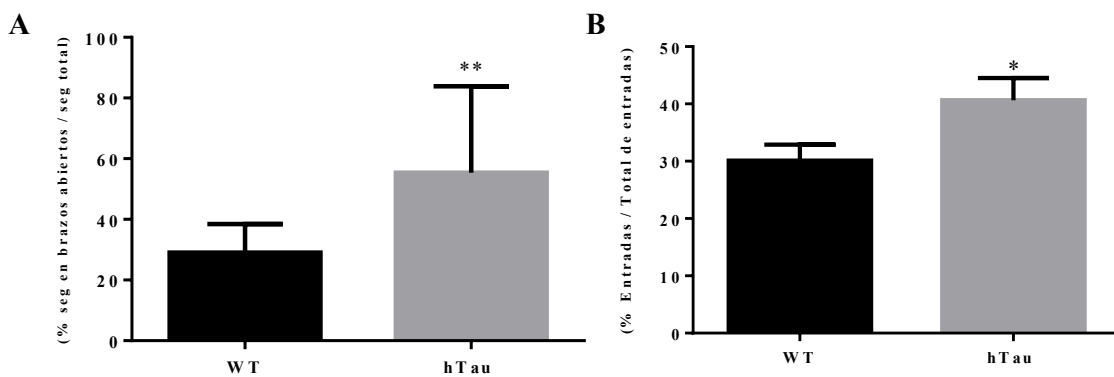


Gráfico 3 - (A) Tiempo pasado en brazos abiertos (p valor < 0,01 prueba *t* de student para datos no apareados) WT, n = 11; hTAU, n = 9. (B) Número de entradas en brazos abiertos en relación con el total de entradas. entradas (p valor 0,0366 prueba *t* de Student no apareado) WT, n = 11; hTAU, n = 9.

Al evaluarlos en este test a los 7-8 meses, los ratones hTAU pasaron más tiempo en los brazos abiertos (valor $p < 0,01$ prueba *t* de student para datos no apareados) y mostraron mayores entradas (0,0366 p-valor de prueba *t* de student no apareado) también, en comparación con el grupo WT. Esto indica una mayor desinhibición por el grupo hTAU.

Los ratones hTAU mostraron aproximadamente el 50% de las entradas a los brazos abiertos, sugiriendo que no hay preferencia por los brazos cerrados. Por su parte, los animales WT mostraron un menor cantidad de entradas en brazos abiertos respecto de los brazos cerrados, consistente con la aversión natural a espacios abiertos de los roedores dado a que son ambientes expuestos o peligrosos.

De esta manera, se observó una diferencia significativa que sugiere una alteración de la percepción de los espacios abiertos como peligrosos, potencialmente debido a una disfunción de la corteza prefrontal en el modelo hTAU, tal como fue previamente descrito (Espíndola et al. 2018).

Asimismo se ensayó la prueba del laberinto elevado en cruz para la cohorte de animales jóvenes (3 meses).

Estudiamos tanto el tiempo que pasaron los animales en los brazos abiertos respecto al tiempo total de exploración del laberinto como las entradas en los brazos abiertos y cerrados.

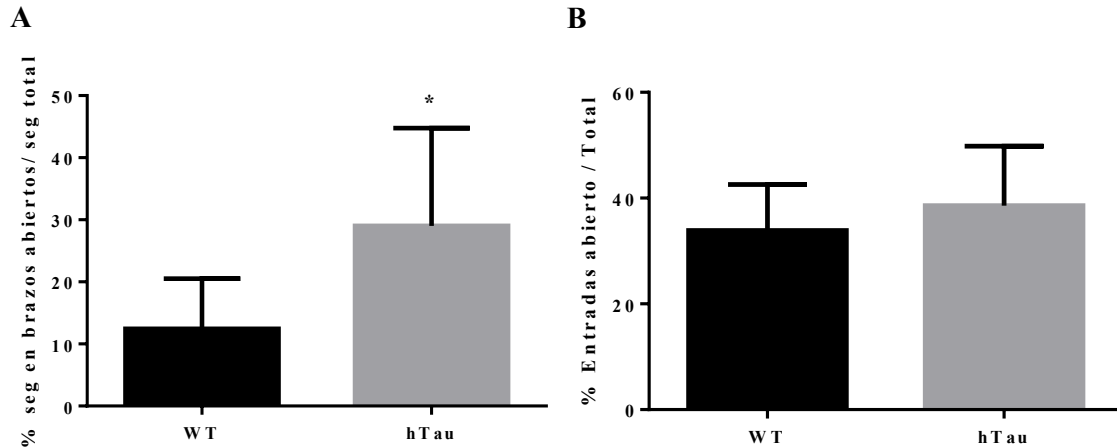


Gráfico 4 - (A) Tiempo pasado en brazos abiertos (p valor 0,0112, prueba t de student para datos apareados). (B) Número de entradas en brazos abiertos en relación con el total de entradas. entradas (No se encontraron diferencias significativas). WT, n = 17, edad 3 meses; hTAU, n = 15, edad 3 meses.

Se observó, en los animales WT, un menor tiempo de exploración en los brazos abiertos respecto de los brazos cerrados, consistente con la inhibición natural de los roedores a los espacios abiertos (gráfico 4A). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de entradas a los brazos abiertos entre grupos (gráfico 4B). Esto podría deberse a que, para la edad de estos ratones, aún no se ha desarrollado una alteración de la percepción de los espacios abiertos como peligrosos, consecuencia de una posible disfunción o desinhibición de la corteza prefrontal.

4.1.1.3 Enterramiento de canicas (Marble burying)

Se llevó a cabo la prueba de enterramiento de canicas para estudiar los comportamientos relacionados con la ansiedad y de excavación en ratones hTAU. De este modo, una reducción en el número de bolitas enterradas indicaría niveles de ansiedad reducidas en los animales. Asimismo, este test permite analizar el comportamiento repetitivo y perseverante (Nicolas, Kolb and Prinssen 2006).

Como se observa en el gráfico 5, estos animales presentaron menor actividad de excavación que los grupos de control WT (0,0139 p valor de prueba *t* de student no apareado) expresado como número de canicas enterradas en una prueba de 30 minutos.

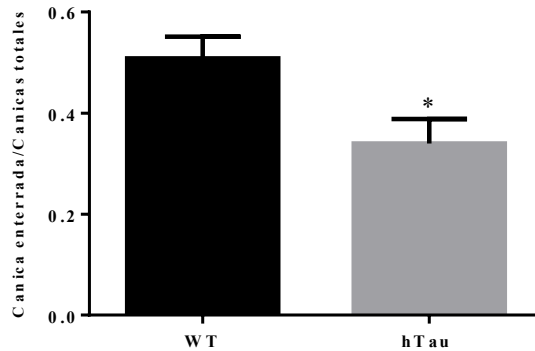


Gráfico 5 – Prueba de enterramiento de canicas (p valor 0,0139, prueba *t* de student no apareado) . Ratones: WT, n = 18, edad 6 y 7 meses; hTAU, n = 15, edad: 6 y 7 meses).

Estos resultados, indican que el grupo WT muestra niveles de ansiedad aumentados respecto al grupo hTAU. Estos no son los resultados esperados.

Los fenotipos analizados, como indicadores de impulsividad y/o ansiedad, se suelen deber a disfunciones en diferentes núcleos del cerebro del modelo hTAU. Lo que nos interesa evaluar en este ensayo es la impulsividad del modelo hTAU y el resultado es contrario a lo esperado.

4.1.1.4 Prueba de anidamiento (Nesting)

Evaluamos el comportamiento de anidación espontáneo como un indicador de la función de la corteza prefrontal en ratones hTAU, permitiéndoles construir un nido de algodón prensado durante la noche. No se encontraron diferencias significativas en lo que respecta al comportamiento innato de los ratones para construir sus nidos, en comparación con el grupo control.

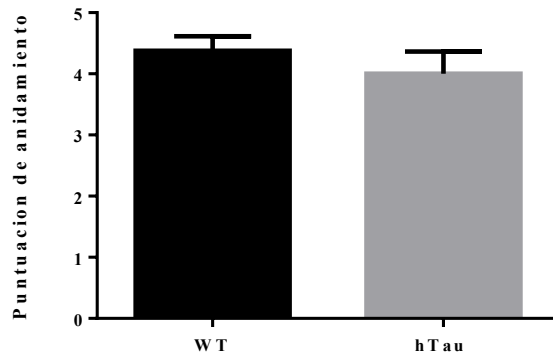
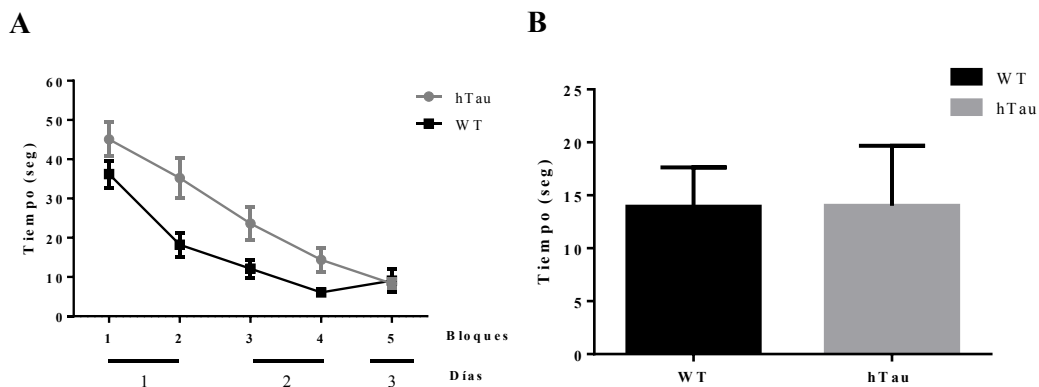


Gráfico 6 – Prueba de anidamiento. No se observan diferencias significativas en comparación con el grupo de control WT. Ratones: WT, n = 18, edad 6 y 7 meses; hTAU, n = 15, edad: 6 y 7 meses.

4.1.1.5 Laberinto de agua (Morris Water Maze)

Dado que la memoria a largo plazo también requiere un componente de la corteza prefrontal, y teniendo en cuenta que en el modelo hTAU existían reportes previos que indican déficits en esta tarea, nos pareció apropiado analizar a los ratones jóvenes para evaluar la existencia de déficits temprano en la memoria espacial de estos.

Al momento de realizar este protocolo, se utilizó una cohorte de animales jóvenes de 4 meses. Se realizaron 2 bloques de entrenamiento los primeros 2 días y un único bloque el tercer día. El último día se realizó la prueba final sin plataforma donde se analizó el tiempo que recorren el cuadrante donde estaba originalmente la plataforma.



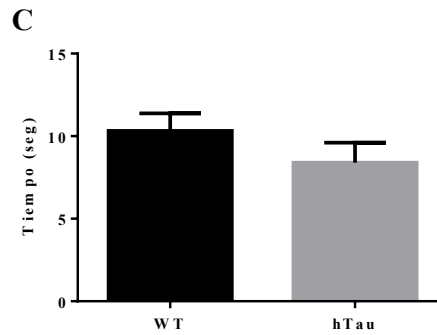


Gráfico 7 – (A) Aprendizaje de la plataforma con claves espaciales. Latencia para encontrar la plataforma. (B) Tiempo en llegar a la plataforma. (C) Prueba final sin plataforma. WT, n = 17, edad 4 meses; hTAU, n = 15, edad 4 meses.

Si bien los ratones hTAU tardaron más tiempo en encontrar la plataforma en los sucesivos bloques de aprendizaje, no demostraron diferencias significativas en el aprendizaje final respecto a los ratones WT (gráfico 7A y 7B). Asimismo, al momento de poner a prueba el aprendizaje en el ensayo sin plataforma (gráfico 7C), los ratones de ambos fenotipos mostraron tiempos similares de búsqueda en el cuadrante correcto.

De este modo, estos resultados no sugieren deterioros tempranos en la memoria espacial en los ratones hTAU, ya que presentaron una performance similar a los ratones control (WT).

4.1.2 Ensayos de olfacción

4.1.2.1 *Puesta a punto*

Se realizó la puesta a punto del protocolo primero con animales WT (n:7, edad: 5 meses). Se realizó un ensayo en el cual se les presentó a cada ratón un recipiente con olores que le son agradables (vainilla, coco y social) o neutro (agua).

En esta prueba se intentó analizar si los animales una vez que conocen un aroma, en las repeticiones consecuentes, pierden el interés. Esto se debe a la curiosidad innata del ratón a aromas novedosos. Como se puede observar en el gráfico 8A los ratones redujeron la exploración de los aromas en las sucesivas repeticiones. Asimismo, el fin de este ensayo es que los ratones conozcan el aroma que se utilizará en los ensayos de olfacción y que no haya un sesgo debido a la curiosidad y el impulso innato de estos a explorar.

Por otro lado, cuando se entrenó a los ratones para que asocien la vainilla con el sitio donde se encuentra la recompensa (gráfico 8B), el tiempo en encontrar la semilla disminuyó en las sucesivas pruebas. De esta manera, se verifica que el ratón aprendió que la recompensa se encuentra en el aroma vainilla guiándose por el olfato.

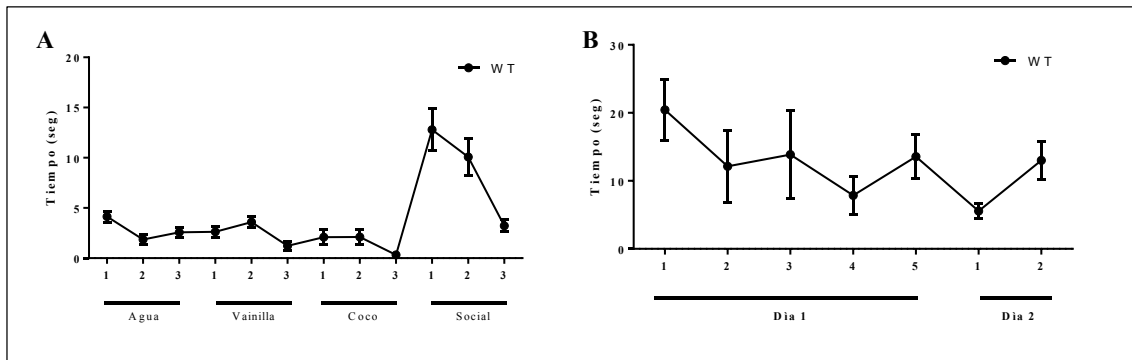


Gráfico 8 - (A) Ensayo de adaptación a olores. (B) Ensayo motivado por recompensa . Ratones WT, n=7; Edad: 5 meses.

Como se mencionó previamente, en la puesta a punto de ambos protocolos también se analizó una cohorte de animales WT y hTAU. Esto permitió ver las tendencias de cada grupo, como por ejemplo, tiempo de exploración en general durante la prueba, interés por los aromas seleccionados, búsqueda activa de la semilla una vez que se encontraban hambreados.

En esta prueba podemos mencionar, tal como muestra el gráfico 9A, que los animales WT y hTAU se comportaron de manera similar entre sí, pero variable respecto a los aromas coco y vainilla. El aroma social, que es el más natural para los ratones macho (ambos genotipos), muestra que en un principio, los ratones exploran por un tiempo prolongado el recipiente y con el correr de los ensayos, disminuye la exploración.

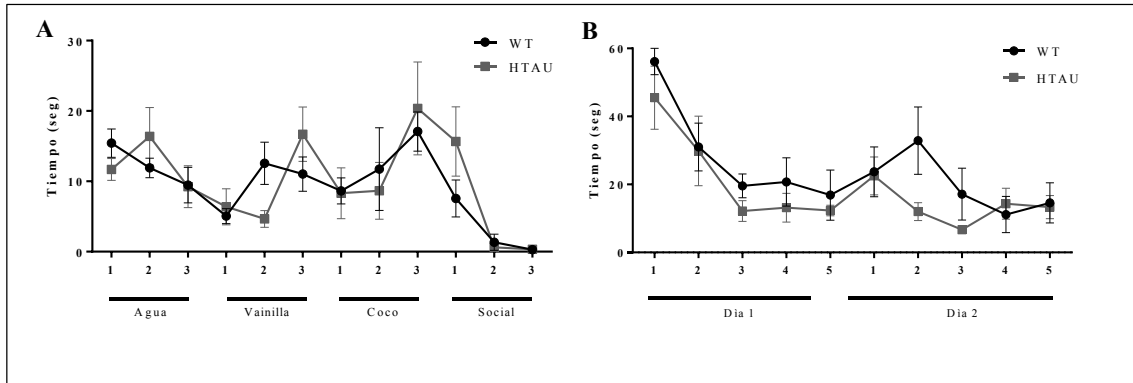


Gráfico 9 - (A) Ensayo de adaptación a olores apetitosos. (B) Ensayo motivado por recompensa . Ratones: WT, n=7, Edad: 5 meses; hTAU, n=6, Edad: 4 a 6 meses.

Por otro lado, en lo que respecta a la búsqueda del alimento mediados por el olfato, hay una diferencia significativa en el tiempo que tardan en encontrar el alimento (gráfico 9B, p valor 0,0188, prueba *t* de student apareada). Además, el tiempo de exploración de los ratones hTAU son similares a los del grupo control WT (p valor 0,5090, prueba *t* de student no apareada, gráfico no mostrado).

4.1.2.2 Análisis de discriminación olfativa

Una vez realizada la puesta a punto de los ensayos olfacción estudiamos comparativamente en ratones WT y hTAU la discriminación olfativa de olores (vainilla-coco). Como puede observar en el gráfico 10, no se obtuvo una diferencia significativa entre el ratón hTAU y el control WT (p valor 0,773, prueba ANOVA de dos vías). De este modo, se puede concluir que ambos fenotipos tienen la capacidad de discriminar esencias, como el coco de la vainilla, para conseguir su recompensa.

Analizamos, por otro lado, la función olfativa como un potencial indicador temprano de patologías neurodegenerativas. Primero, se evaluó la respuesta innata a ciertos olores, previamente descritos como neutros o apetitivos, en una cohorte nueva de animales, incorporando también ratones hembra.

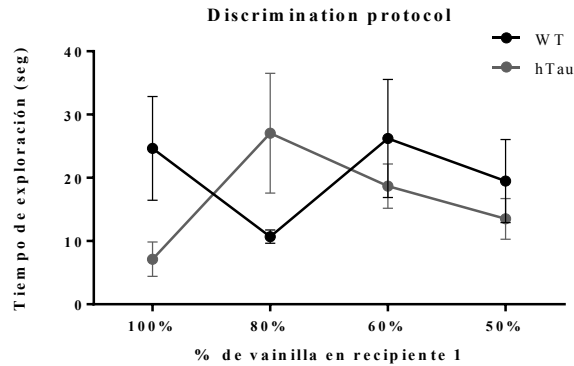


Gráfico 10 – Discriminación olfativa de esencias. Coco (1:5000) y vainilla (1:5000). Se combinan las esencias en diferentes porcentajes hasta llegar a un 50% de cada una por recipiente. Ratones: WT n=7; edad: 6 meses y hTAU n=6; edad: 5 a 7 meses.

Se analizaron los resultados de hembras y machos, tanto en conjunto como por separado. Los resultados obtenidos en conjunto (gráfico 11A) nos permite evaluar la respuesta hedónica a los olores y que los ratones hTAU reconocen los olores como novedosos y con el tiempo van perdiendo el interés, al igual que el grupo control WT.

Este test permite, de manera análoga al ensayo de reconocimiento de objeto novedoso (NOR), hacer una evaluación del rendimiento cognitivo, involucrando la función olfativa, a corto plazo (ya que, entre las diferentes repeticiones de cada aroma no hay un periodo de tiempo extenso como ocurre en el NOR). De esta manera, los ratones hTAU exploran el aroma novedoso por primera vez por un tiempo mayor que en las sucesivas repeticiones del aroma, al igual que el grupo control WT.

Si bien inicialmente se decidió utilizar una cohorte de ambos sexos, al analizar por separado la exploración de los aromas, se encontraron diferencias en los resultados de las hembras respecto de los machos (gráficos 11B y 11C). Esto se debería a que, por razones hormonales, los ratones macho suelen ser más estables en los que refiere experimentos de comportamiento generales y en particular a los ensayos de olfacción. Debido a estas las diferencias encontradas, se decidió proseguir la investigación solo con animales macho.

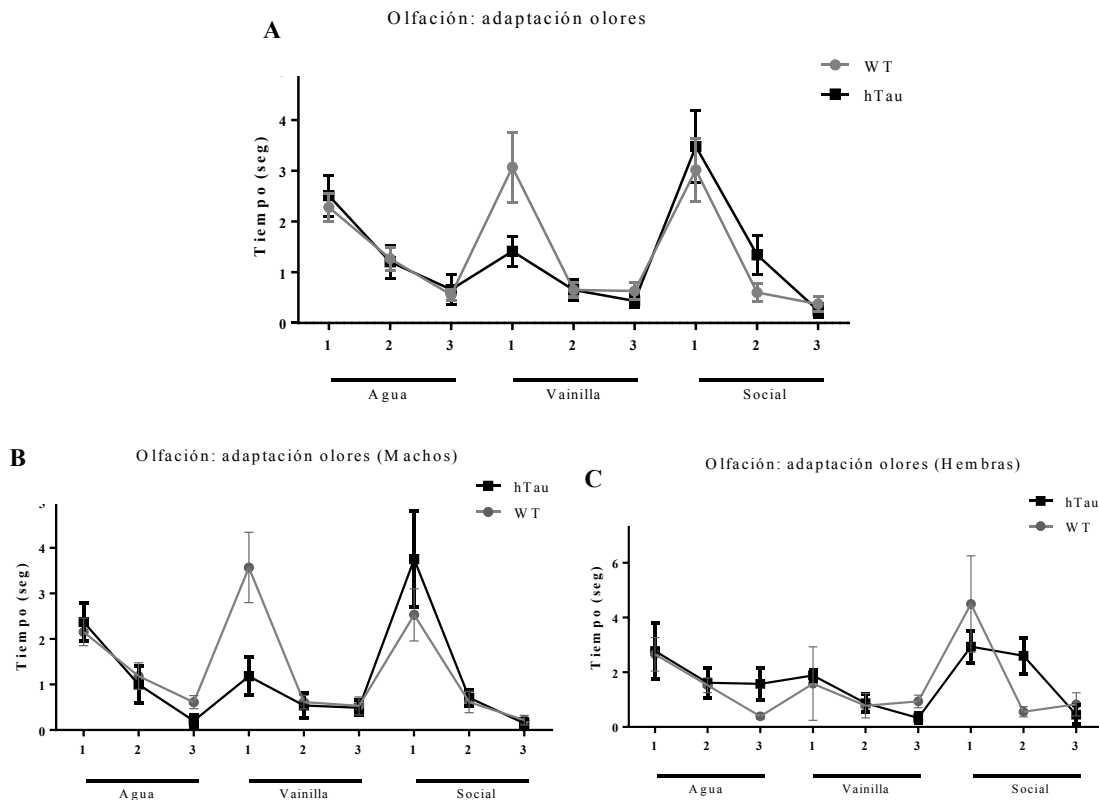


Gráfico 11 - Habituaación a aromas neutros (agua) y apetitosos (vainilla 1:5000, social). (A) Pool (WT, n=12, edad 6 meses; hTAU, n=9, edad 6 meses); (B) Machos (WT, n=9, edad 6 meses; hTAU, n=6, edad 6 meses); Hembras (C) (WT, n=3, edad 6 meses; hTAU, n=3, edad 6 meses).

Seguidamente evaluamos qué tan sensible es el animal hTAU a los olores, escondiendo una semilla de girasol en el lecho de la jaula (gráfico 12). Se registró el tiempo empleado para encontrar la semilla.

Los animales fueron entrenados en un protocolo diseñado por el grupo colaborador (Alonso et al. 2006; 2012; Grelat et al. 2018). Este ensayo nos permite estudiar la función olfativa a través de tareas de diferente dificultad en función de los pares de olores o mezclas de olores utilizados. Además, podemos evaluar el umbral de detección de olores y memoria olfativa.

Como se mencionó previamente, el protocolo consistió en cinco ensayos por día, durante dos días consecutivos. Analizando los datos en conjunto (hembras y macho) nos encontramos con que con tiempos de exploración y de arribo a la semilla son elevados comparados con el grupo control WT (p valor 0,0036, prueba t de student apareada). Este

indicio podría sugerir un fenotipo temprano en la pérdida en la memoria olfativa por parte de los ratones hTAU.

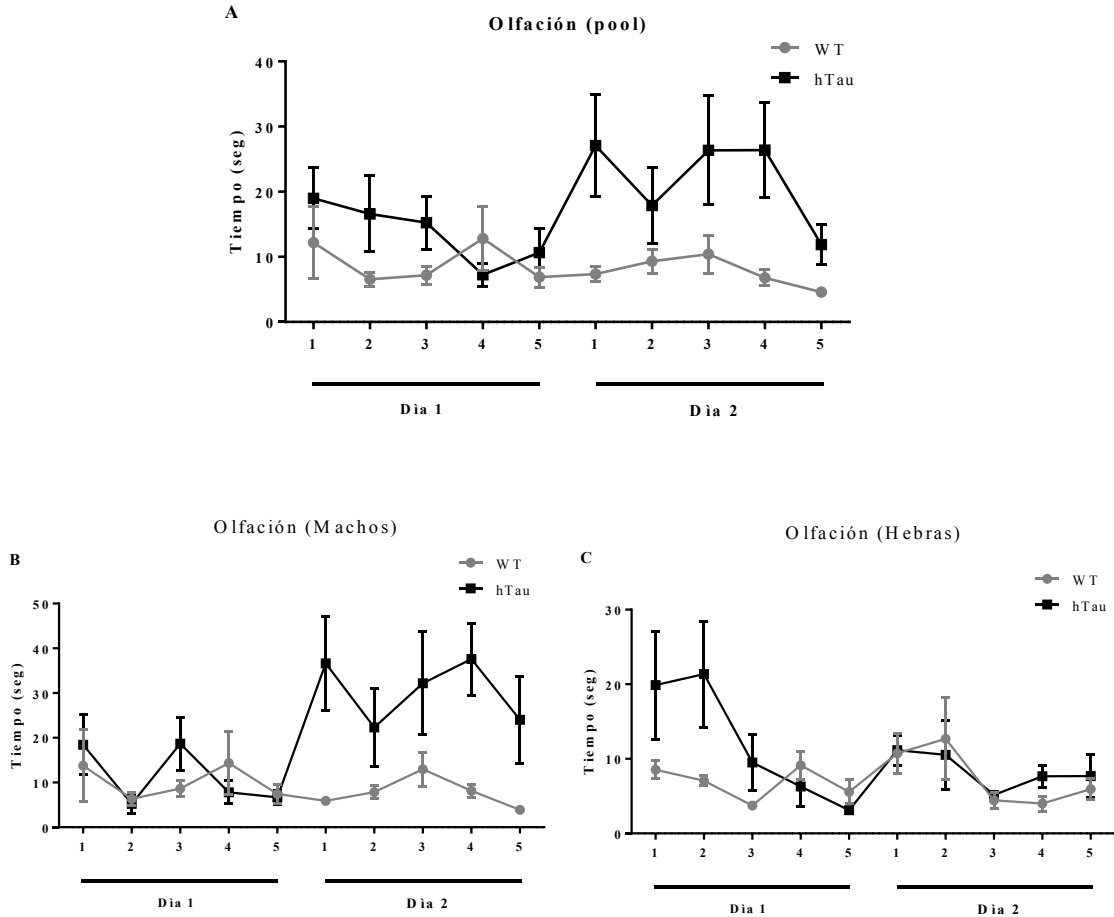


Gráfico 12 – Ensayo de motivación por recompensa. (A) Pool (WT, n=12, edad 6 meses; hTAU, n=9, edad 6 meses); (B) Machos (WT, n=9, edad 6 meses; hTAU, n=6, edad 6 meses); Hembras (C) (WT, n=3, edad 6 meses; hTAU, n=3, edad 6 meses).

Profundizando en los resultados obtenidos, y estudiando los datos obtenidos separando por sexo, en los ratones hembra hTAU, no se encontraron diferencias significativas en comparación con el grupo WT (p valor 0,1344 prueba *t* de student apareado). Sin embargo, los machos hTAU mostraron un tiempo significativamente más largo para encontrar la semilla en comparación con el WT (p valor 0,0168, prueba *t* de student apareado).

4.1.3 Análisis de actividad metabólica por microPET

A fin de determinar los núcleos cerebrales con actividad metabólica diferencial en el modelo hTAU se analizó el estudio de imágenes *in vivo* por micro-PET para animales pequeños de laboratorio. La marcación ¹⁸F-FDG, que se localiza y acumula en tejidos metabólicamente activos, nos permitió analizar la actividad cerebral de nuestro modelo animal hTAU.

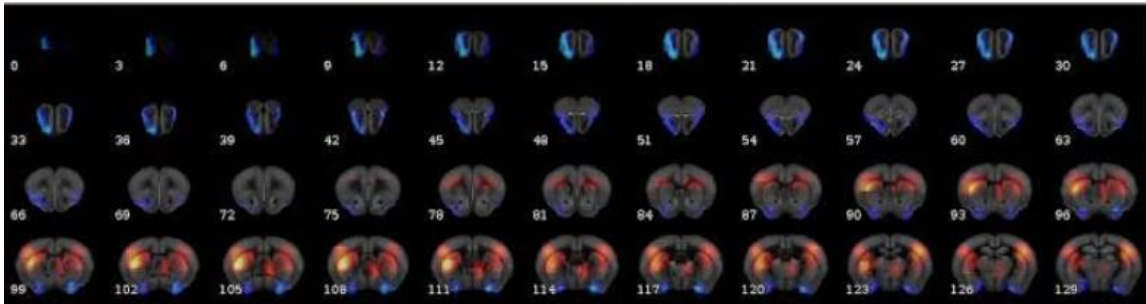


Figura 3 - Captación específica (corte coronal) de todo el cerebro utilizando el marcador ¹⁸F-FDG (fluorodeoxiglucosa-¹⁸F) en ratones hTAU de 7 meses de edad. Marcación azul: hipometabolismo, rojo: hipermetabolismo.

En el análisis de las imágenes obtenidas del ensayo microPET, podemos ver desde la imagen 0 a 42 una marcación azul en la zona del bulbo olfatorio y en las imágenes posteriores 42 a 75, como continua esa marcación azul en la corteza piriforme. La marcación azul indica un hipometabolismo de glucosa en esa zona.

En la sección coronal 3 (ver [ilustración 3](#) para más detalles) se observa que la marcación azul va desde la capa de células granulares hasta la capa plexiforme externa. Podemos orientarnos con la figura 4 (ver [ilustración 4](#) para más detalle) que las zonas del cerebro afectadas son: GL, capa glomerular; Mi, célula mitral; OB, bulbo olfatorio; OE, epitelio olfatorio; ON, neuronas sensoriales olfativas; OT, tubérculo olfatorio y Pir, corteza piriforme.

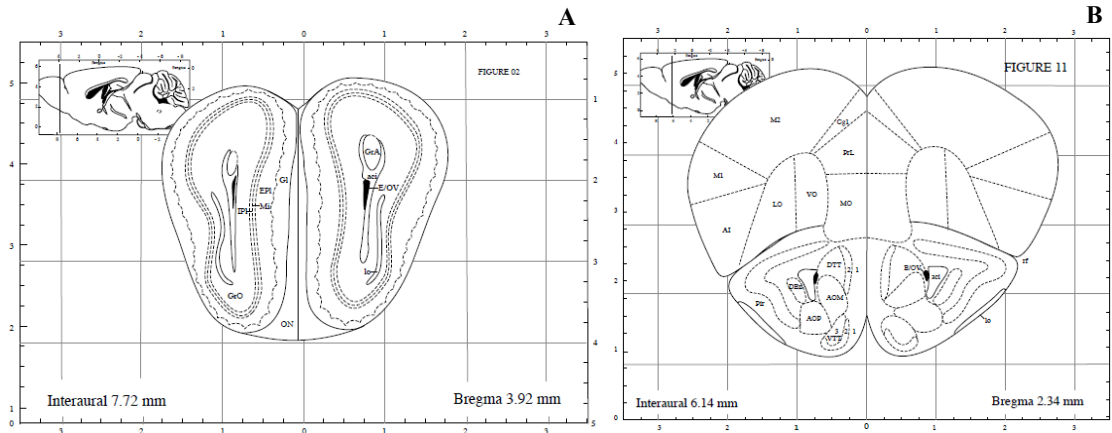


Figura 4 - Cerebro de ratón en coordenadas estereotáxicas (Paxinos, Franklin and Franklin 2001). (A) región anterior, zona del bulbo olfatorio. (B) región más posterior del cerebro, parte del bulbo olfatorio, corteza prefrontal y corteza piriforme.

Siendo que este diagnóstico por imágenes *in vivo* nos proporciona mediciones cuantitativas del curso temporal de biomoléculas, nuestros resultados sugieren que un hipometabolismo en la zona del bulbo olfatorio estaría asociado a una reducción de la actividad celular tal como reacciones enzimáticas, interacciones ligando-receptor, metabolismo celular, migración celular, entre otros. Si bien la menor actividad no está correlacionada directamente con la muerte celular, es un posible indicador de procesos neurodegenerativos tempranos.

4.1.4 Detección de tau hiperfosforilada por Inmunohistoquímica

Los análisis de la patología tau que fueron realizados previamente en el modelo de ratón hTAU reportan la presencia de agregados de proteína tau hiperfosforilada tanto en la corteza como en el hipocampo de los ratones hTAU seniles, de 9-12 meses (Polydoro et al. 2009; Espíndola et al. 2018).

En este estudio, basándonos en los resultados obtenidos en los ensayos de comportamiento y en el análisis de microPET, realizamos un ensayo de inmunohistoquímica para detectar la presencia de agregados de tau en regiones relacionadas a la función olfativa. Para esto se utilizó un anticuerpo específico contra las formas de tau con hiperfosforilación patológica en T231/S235 (anticuerpo AT-180) en ratones hTAU de 6-8 meses.

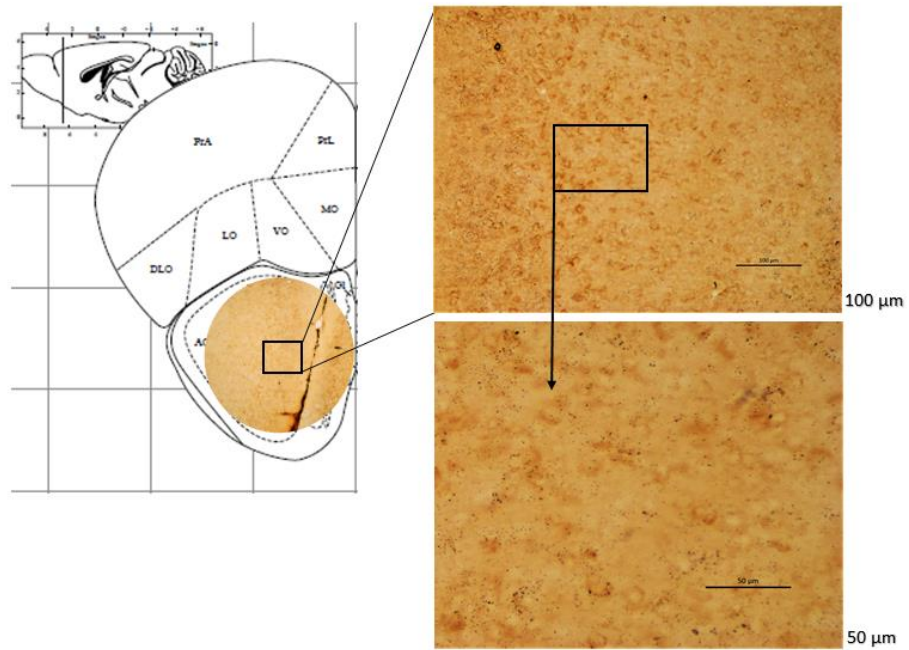


Figura 5 - Caracterización del estado de hiperfosforilación (AT180 positivo) en parte frontal de la corteza piriforme, en ratones hTAU de 6-8 meses de edad.

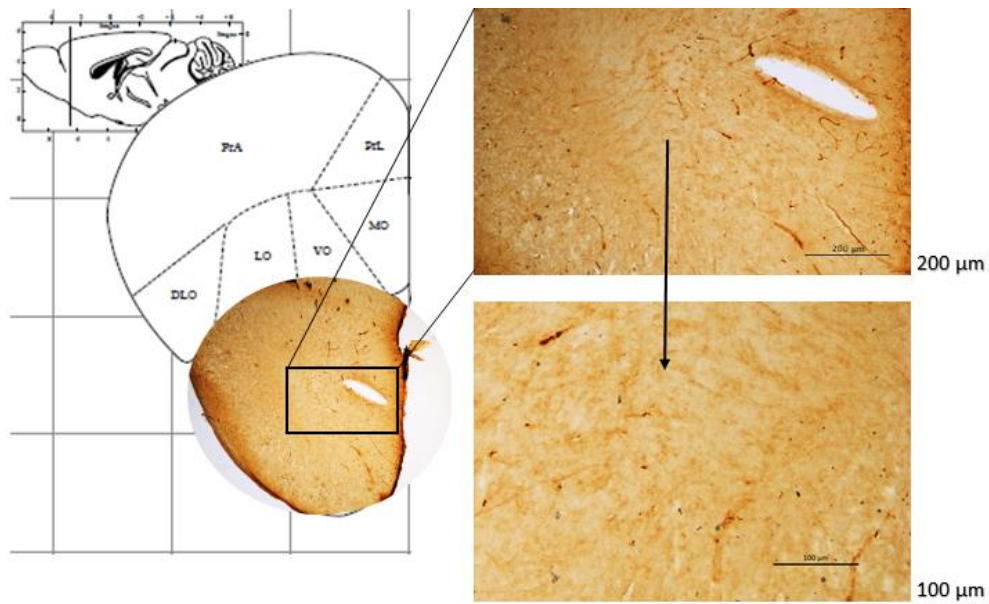


Figura 6 - Caracterización del estado de hiperfosforilación (AT180 negativo) en parte frontal de la corteza piriforme, en ratones WT de 6 meses de edad.

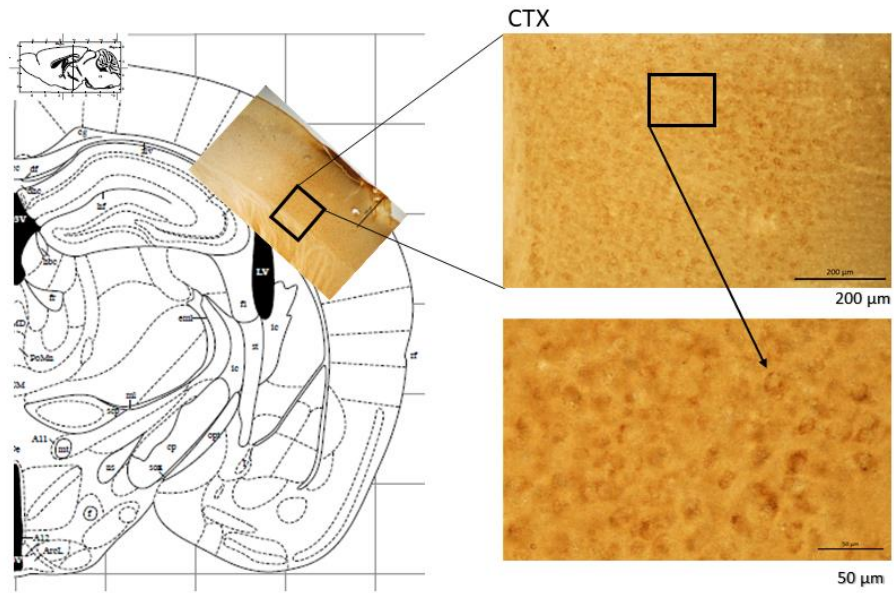


Figura 7 – Caracterización del estado de hiperfosforilación (AT180 positivo) en la corteza prefrontal (CTX), en ratones hTAU de 6-8 meses de edad.

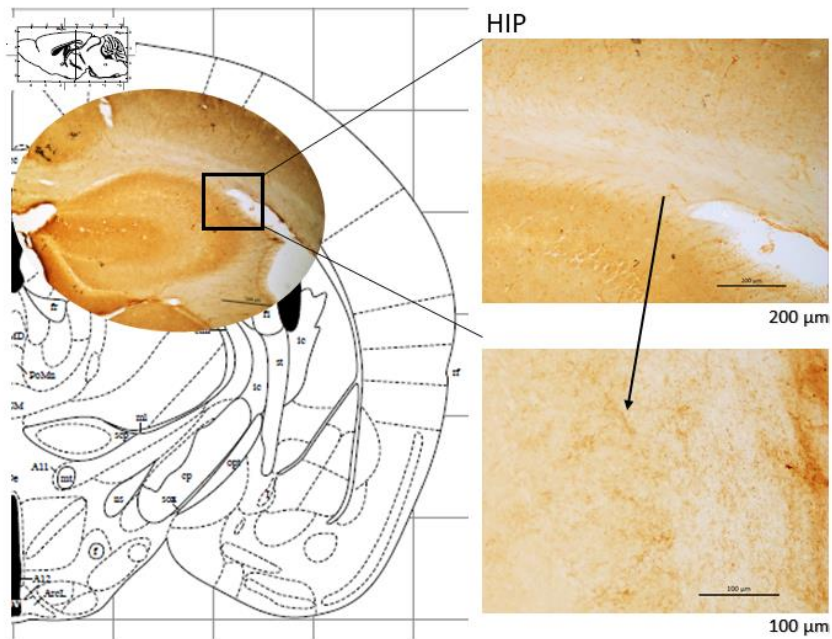


Figura 8 - Caracterización del estado de hiperfosforilación (AT180 negativo) en el hipocampo (HIP), en ratones WT de 6 meses de edad.

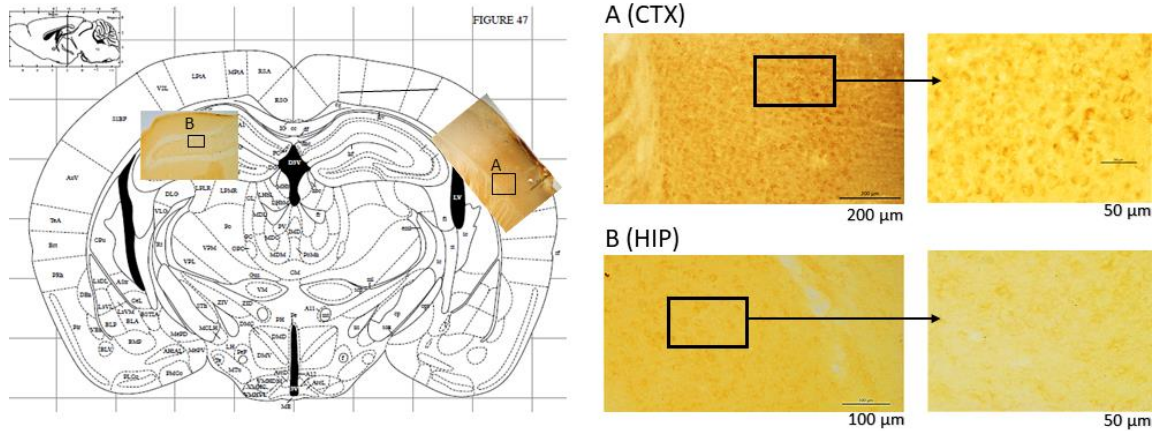


Figura 9 - Caracterización del estado de hiperfosforilación (AT180 positivo) en la corteza prefrontal (CTX)/hipocampo(HIP), en ratones hTAU de 6-8 meses de edad.

Como control positivo se utilizaron cortes coronales de la corteza piriforme (figura 5), corteza prefrontal (figura 7 y 9) y del hipocampo (figura 9). También se incluyeron cortes seriados del bulbo olfatorio (figura 10) para evaluar la presencia de tau hiperfosforilada en esta región en ratones hTAU de 6-8 meses de edad. Se pudo evidenciar tinción positiva de tau hiperfosforilada en estas estructuras, tanto en el control positivo como en el bulbo olfatorio, que presenta neuronas con tinción en la zona somatodendrítica pero no en axones, consistente con la localización celular de tau en condiciones patológicas. Si bien dicha marca no puede considerarse fehacientemente como agregados neurofibrilares (NFTs), sí son indicativos de hiperfosforilación patológica de tau.

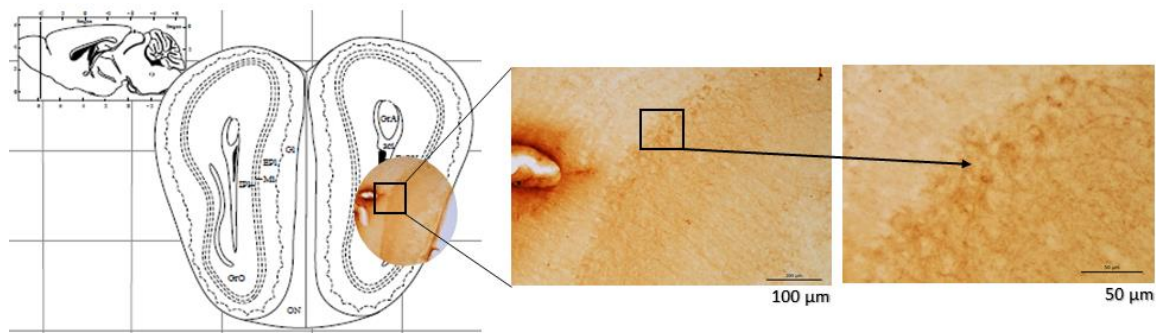


Figura 10 - Caracterización del estado de hiperfosforilación (AT180 positivo) en la bulbo olfatorio, en ratones hTAU de 6-8 meses de edad.

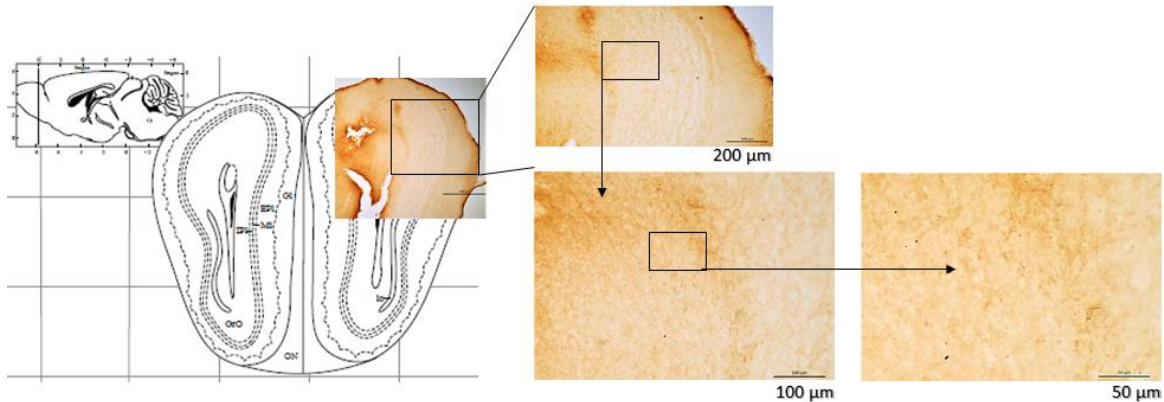


Figura 11 - Caracterización del estado de hiperfosforilación (AT180 negativo) en la bulbo olfatorio, en ratones WT de 6-8 meses de edad.

4.1.5 **Western-Blot**

Los análisis de la patología tau que habían sido realizados previamente en el modelo de ratón hTAU habían reportado la presencia de agregados de proteína tau hiperfosforilada tanto en la corteza como en el hipocampo de los ratones hTAU seniles, de 9-12 meses, (Andorfer et al. 2003; Polydoro et al. 2009).

En general en las taupatías, hay presencia de Tau hiperfosforilada, indicativo de un exceso de fosforilaciones en sitios que pueden llevar al mal plegamiento proteico y que, por lo tanto, afecten su actividad biológica.

Como complemento de los ensayos de inmunohistoquímica otro modo de detectar la fosforilación tardía y patológica de Tau es a través de ensayos de western blot en lisados de determinadas estructuras cerebrales. En este estudio se analizaron los niveles de Tau hiperfosforilada en ratones hTAU de 7 meses en el bulbo olfatorio, utilizando el anticuerpo anti-Phospho-Tau-Thr231 (AT180).

Se extrajo la proteína total de las estructuras en estudio (bulbo olfatorio) y se procedió a determinar separadamente el contenido de Tau hiperfosforilada a través del anti-Phospho-Tau-Thr231 y Tau total (AT180 y DAKO respectivamente). Como control de carga se utilizó beta-actina.

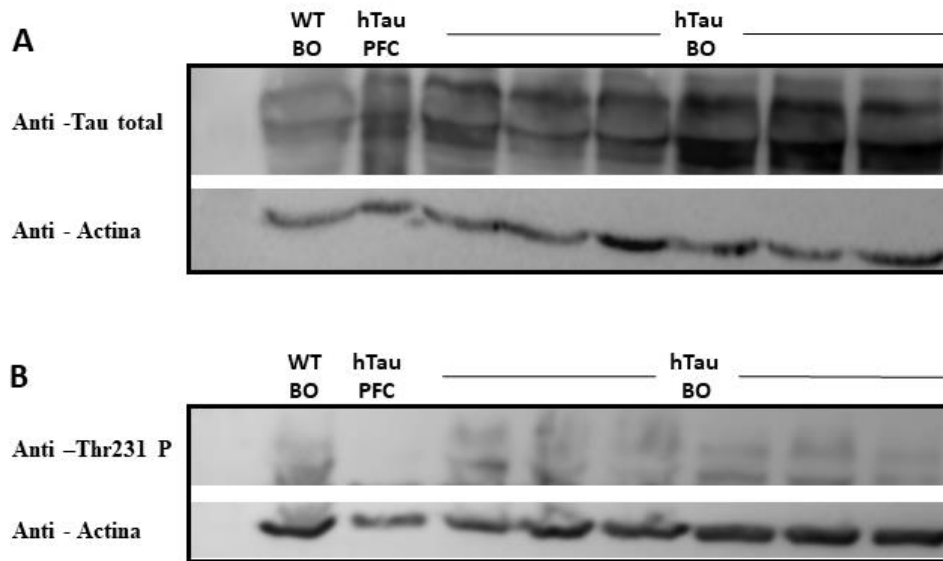


Figura 12 - Caracterización de los niveles de Tau hiperfosforilada y su comparación con Tau total, en el ratón hTAU en el bulbo olfatorio. Ratones: WT edad 7 meses; hTAU, edad 6 a 8 meses.

El objetivo de esta caracterización fue comparar de una forma cualitativa la presencia de proteína Tau hiperfosforilada respecto de los niveles totales de esta proteína.

Se analizó un ratón WT como control de la hiperfosforilación de Tau, dado que los ratones no presentan niveles significativos de Tau hiperfosforilada en el epítipo Thr231. Asimismo, se incluyó una muestra de corteza prefrontal (PFC) de ratón hTAU de 7 meses, dado que en esta edad los niveles de tau hiperfosforilada en esta estructura son bajos.

Podemos encontrar una significativa cantidad de Tau total en el bulbo olfatorio en comparación con la cantidad de Tau hiperfosforilada en ratones hTAU de 7 meses (figura 12). Los cuales no se detectaron en la PFC del mismo grupo.

Por otro lado, podemos observar que los niveles de tau total en el grupo hTAU están aumentados respecto al animal WT, lo cual era esperable debido al hecho de ser transgénicos (con más de una copia del transgen MAPT) y además es consistente con otros trabajos previos en otras estructuras (Andorfer et al. 2003; Duff et al. 2000).

Este análisis preliminar de Tau hiperfosforilada mediante western blot aún se debe perfeccionar. Como parte de mi futura tesis doctoral, uno de mis primeros objetivos será

corroborar estos resultados, repitiendo ensayos con mayor número de muestras de bulbo olfatorio y corteza prefrontal de animales hTAU de diferentes edades.

5 Discusión

Nuestra hipótesis de trabajo asume que la formación de especies tóxicas de Tau (por isoformas en exceso) deriva en fenotipos tempranos, previos a la formación de agregados y al déficit cognitivo.

En este proyecto describimos ciertos fenotipos tempranos del modelo murino hTAU. Principalmente la disfunción olfativa (potencial indicador temprano de patologías neurodegenerativas), complementándolo con ensayos comportamentales clásicos e identificado la disfunción metabólica y la presencia de tau patológica en los núcleos cerebrales que pudiesen estar implicados en el origen de los fenotipos en estudio.

Frente a la evidencia recaudada a través del análisis comparativo de este modelo y su contraparte salvaje (wild-type), podemos listar algunas conclusiones preliminares obtenidas en este trabajo:

1. En los ensayos comportamentales, los ratones hTAU mostraron deterioros cognitivos y de memoria, y comportamiento asociado a la ansiedad en comparación con el grupo WT, a los 6 meses de edad (jóvenes) anterior al deterioro previamente reportado a partir los 9 meses de edad.
2. En el análisis del déficit olfativo en el modelo, se observaron tiempos de exploración y de arribo a la semilla elevados en el grupo hTAU comparados con el grupo control WT, indicando un potencial déficit olfativo asociado patologías neurodegenerativas.
3. Se destaca un hipometabolismo de glucosa en las regiones del bulbo olfatorio y corteza piriforme de forma temprana en ratones jóvenes (6 meses). Esto indica una reducción del metabolismo y por consiguiente sugiere un posible indicador de procesos neurodegenerativos tempranos.
4. En los ensayos neuroquímicos post-mortem (inmunohistoquímica y western blot) se detectó Tau hiperfosforilada en el grupo experimental hTAU. De esta

manera, nuestro estudio complementa trabajos realizados previamente en nuestro grupo de trabajo, donde se observó Tau hiperfosforilada en el modelo hTAU de 9-12 meses de edad.

A partir de estos resultados, hemos planteado realizar estudios futuros para determinar de manera más precisa los fenotipos tempranos observados en el modelo hTAU, así como también esclarecer los mecanismos moleculares subyacentes a estos comportamientos.

A continuación, se discutirán las hipótesis que surgen de estos resultados considerados en conjunto con evidencias previas y con otros resultados de nuestro grupo de trabajo.

Disfunción olfativa en modelo de ratón hTAU joven

En el estudio de las enfermedades neurodegenerativas, y particularmente de las demencias, uno de los desafíos más ambiciosos es la detección de signos clínicos que precedan al deterioro cognitivo y que permitan establecer el estadio prodrómico de la enfermedad. Siendo que uno de los síntomas que desde hace más de una década ha sido asociado con estadios preclínicos de Enfermedad de Alzheimer (EA) es el déficit olfativo (Devanand et al. 2000), se estudió la conducta olfativa en ratones jóvenes hTAU (6 meses) y se lo comparó con su contraparte WT.

En este trabajo se realizaron ensayos de respuesta innata a los olores y de memoria olfativa siguiendo protocolos descriptos por la Dra. Mariana Alonso (Laboratorio de Percepción y Memoria, Instituto Pasteur, Paris) donde estudiamos los efectos de la disfunción de Tau sobre el aprendizaje y la memoria utilizando una tarea de discriminación olfativa motivada por la recompensa. Se demostraron comportamientos asociados a una pérdida de la función olfativa en el grupo experimental hTAU comparados con el grupo control. Adicionalmente, en el grupo hTAU, estudiado se detectó una reducción en el metabolismo de glucosa en las regiones del cerebro asociadas a la función olfativa. De esta forma, es posible establecer una correlación entre el déficit olfativo con una reducción de la actividad celular en la zona que puede, a su vez, estar asociada a la presencia de Tau patológica (agregados de tau hiperfosforilada).

Algunas evidencias recientes sugieren que los déficit olfativos en las enfermedades neurodegenerativas se deberían al inicio de la formación de proteínas tóxicas en los núcleos del sistema olfatorio que luego se propagan al resto del cerebro (Roberts et al. 2016). En el caso de

las taupatías la propagación de tipo priónico ha sido demostrada en modelos *in vitro* e *in vivo* (Jucker and Walker 2013; Cope et al. 2018). Además, el mecanismo de acumulación y propagación de formas tóxicas de tau podría interferir en los procesos de neurogénesis que ocurren en el bulbo olfativo. Esta idea se basa en reportes previos en el ratón hTAU en que se observara un descenso temprano de la neurogénesis en el hipocampo (Komuro et al. 2015).

De todos modos, aún no se conocen los procesos moleculares subyacentes a este déficit (Zhang 2016), ni tampoco se sabe si esta asociación puede ocurrir en otros tipos de taupatías o si es inherente sólo a la Enfermedad de Alzheimer.

Bajo esta hipótesis entonces, el inicio de la patología podría generarse en estructuras olfativas que, posteriormente, se propagan de forma “priónica” a otras áreas del cerebro con las cuales las estructuras olfativas interactúan. Los agregados de proteínas se forman en un pequeño número de células cerebrales, a partir de las cuales se propagan intracelularmente (Goedert, Clavaguera and Tolnay 2010; Goedert et al. 2014; Goedert and Spillantini 2017). La propagación de la patología de tau durante el curso clínico de las taupatías apunta a la existencia de mecanismos para la transferencia intercelular de agregados de tau. Esta noción se ha corroborado mediante la identificación y caracterización de la propagación de las inclusiones de tau de célula a célula (Clavaguera et al. 2013).

Fenotipos cognitivos tempranos en modelo hTAU

Para complementar el estudio de fenotipos cognitivos tempranos en el modelo de ratón hTAU, se realizaron ensayos clásicos de comportamiento.

Para describir los fenotipos cognitivos asociados a la memoria de corto y largo plazo, empleamos el ensayo de reconocimiento de objeto novedoso (NOR). En este estudio, el grupo experimental hTAU (6 meses) fue capaz de recordar el objeto familiar al igual que su contraparte WT. No obstante, el grupo hTAU mostró menor exploración del objeto novedoso. Estos resultados son consistentes con trabajos previamente reportados que indican un déficit cognitivo en el ratón hTAU (Polydoro et al. 2009)

Asimismo, se evaluaron estos fenotipos cognitivos asociados a memoria de corto y largo plazo y la memoria espacial, en ratones de 3-4 meses utilizando la prueba NOR y el laberinto de agua (Morris Water Maze, MWM). No observamos diferencias significativas, entre el grupo

experimental y control, en ningunas de las dos pruebas en ese rango etario. Estos resultados sugieren que no habría deterioros tempranos en la memoria a corto y largo plazo, así como tampoco en la memoria espacial.

Por otro lado, para evaluar comportamientos de ansiedad y desinhibición se realizó la prueba del laberinto elevado en cruz y el test de enterramiento de bolitas. El aumento en las entradas y permanencia en los brazos abiertos del laberinto en cruz en comparación al grupo de ratones WT, sugiere un fenotipo de desinhibición comportamental, el cual ya ha sido descrito en otros modelos de ratón de taupatía (Schindowski et al. 2006). Por otro lado, no encontramos resultados que demuestran un comportamiento de ansiedad/impulsividad en el enterramiento en el grupo experimental como se ha observado previamente en estudios realizados por el grupo de trabajo.

Por último, para analizar la conducta repetitiva y perseverante en el modelo experimental, se ensayó el test de enterramiento de bolitas. Los resultados obtenidos mostraron un reducido número de bolitas enterradas por el grupo hTAU, con un promedio de 3 bolitas enterradas, a diferencia de los grupos WT.

Por otro lado, el modelo hTAU presenta un fenotipo de hiperactividad y ansiedad en el ensayo de enterramiento de bolitas. Además, se asume que una reducción en el número de bolitas enterradas indicaría niveles de ansiedad reducidas en los animales (Espíndola et al. 2018), por consiguiente, los resultados obtenidos en esta prueba no resultaron los esperados. Esto se puede deber a que el protocolo se realizó con una cantidad de canicas incorrecta y un tiempo de espera corto a comparación de otros protocolos ensayados.

En conjunto, esta batería de ensayos nos permitió describir el comportamiento del modelo animal hTAU y contrastarlo con su contraparte WT.

Presencia de Tau tóxica en regiones específicas estudiadas

Se realizaron análisis neuroquímicos en núcleos asociados a la función olfativa: bulbo olfatorio, corteza piriforme y asociados con la memoria, ansiedad, desinhibición, entre otros comportamientos: corteza prefrontal e hipocampo.

La pregunta principal planteada al momento de realizar este análisis fue discriminar si efectivamente los déficits olfativos/cognitivos encontrados en los ensayos comportamentales y

de olfacción son preexistentes a la presencia de Tau hiperfosforilada, como indicador de patología. Mediante inmunohistoquímica se buscó localizar específicamente en el tejido la presencia de los agregados marcando Tau hiperfosforilada y mediante western-blot pretendíamos obtener un resultado cuantitativo de Tau hiperfosforilada.

El análisis neuroquímico y funcional que se hizo en el curso de este estudio mostró hiperfosforilación patológica en los ratones jóvenes hTAU (6 meses), principalmente en áreas corticales (corteza prefrontal, bulbo olfatorio y corteza piriforme), lo que se podría correlacionar con los déficits cognitivos observados en los ensayos comportamentales. Se han reportado con anterioridad déficits cognitivos dependientes del área hipocampal en este mismo modelo en animales de 9-12 meses (Polydoro et al. 2009).

Actualmente, se están explorando varios biomarcadores de la enfermedad del Alzheimer (EA). Se están explorando las concentraciones de b-amiloide y tau en el líquido cefalorraquídeo, 18F-fluorodesoxiglucosa, b-amiloide y el volumen del hipocampo, y las pruebas neuropsicológicas, por su utilidad, para predecir el inicio y la etapa de la EA (Wesson, Wilson and Nixon 2010).

De este modo, la presencia de Tau hiperfosforilada en el bulbo olfatorio, y a la consecuente pérdida de capacidad olfativa, podrían ser un posible biomarcador que nos permita detectar tempranamente patologías asociadas a Tau.

Perspectivas futuras

En conjunto, los resultados obtenidos en los abordajes experimentales realizados en este trabajo refuerzan las evidencias de fenotipos tempranos asociados déficits cognitivos y sensoriales en el modelo hTAU murino. Asimismo, demostramos la presencia de agregados de proteína tau hiperfosforilada en el bulbo olfativo en etapas previas al deterioro cognitivo y se sugiere la disfunción olfativa como un posible biomarcador de patología tau en el cerebro.

Para concluir, actualmente hay dos hipótesis respecto al desarrollo de las taupatías donde puede ser que: la pérdida de función (ausencia de proteína Tau funcional) lleva al déficit en la actividad neuronal y consecuentemente a los fenotipos asociados o la ganancia de función tóxica (presencia de formas tóxicas de proteína Tau) provocaría la muerte neuronal y el déficit conductual.

Como parte de mi Tesis Doctoral, a desarrollarse en los próximos años, la hipótesis de partida asume que tanto la falta de función como la ganancia de función toxica tendrán consecuencias patológicas en modelos murinos de taupatía. De esta modo, a futuro se buscará elucidar las consecuencias funcionales de la perdida de función o de la ganancia de función tóxica de tau en el modelo experimental murino utilizado en este trabajo. Uno de los primeros objetivos será caracterizar la aparición de (bio)marcadores tempranos en regiones definidas del cerebro de ratones TauKO y hTAU, particularmente en las áreas implicadas en la función olfativa que indiquen patología. Asimismo, se estudiará la regulación temprana de la expresión y el procesamiento post transcripcional de Tau en núcleos cerebrales candidatos a iniciar la patología ya que los mecanismos moleculares que subyacen al déficit cognitivo/olfativo, aun no se conocen.

En base a los resultados obtenidos, será posible continuar con una nueva línea de investigación en el laboratorio de Terapéutica Experimental de los Procesos Neurodegenerativos que nos permita complementar y desarrollar este estudio.

Continúa siendo un gran desafío para nuestro laboratorio detectar aquellos fenotipos tempranos indicadores de la patología tau, que permitan identificar los núcleos cerebrales y la ventana temporal óptima para realizar intervenciones terapéuticas con el fin de evitar el inicio y/o la propagación de la patología, con el objetivo final de sentar las bases de terapias racionales y efectivas para las taupatías humanas.

6 BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO, M., LEPOUSEZ, G., WAGNER, S., BARDY, C., GABELLEC, M.M., TORQUET, N. and LLEDO, P.M., 2012. Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory. *Nature Neuroscience*, vol. 15, no. 6. ISSN 10976256. DOI 10.1038/nn.3108.
- ALONSO, M., VIOLLET, C., GABELLEC, M.M., MEAS-YEDID, V., OLIVO-MARIN, J.C. and LLEDO, P.M., 2006. Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 41. ISSN 02706474. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2633-06.2006.
- ANDORFER, C., KRESS, Y., ESPINOZA, M., DE SILVA, R., TUCKER, K.L., BARDE, Y.A., DUFF, K. and DAVIES, P., 2003. Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *Journal of Neurochemistry*, vol. 86, no. 3. ISSN 00223042. DOI 10.1046/j.1471-4159.2003.01879.x.
- ATTEMS, J., WALKER, L. and JELLINGER, K.A., 2014. *Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases*. 2014. S.l.: Springer Verlag.
- AVALE, M.E., NEMIROVSKY, S.I., RAISMAN-VOZARI, R. and RUBINSTEIN, M., 2004. Elevated serotonin is involved in hyperactivity but not in the paradoxical effect of amphetamine in mice neonatally lesioned with 6-hydroxydopamine. *Journal of Neuroscience Research*, vol. 78, no. 2. ISSN 03604012. DOI 10.1002/jnr.20245.
- AVALE, M.E., RODRÍGUEZ-MARTÍN, T. and GALLO, J.-M., 2013. Trans-splicing correction of tau isoform imbalance in a mouse model of tau mis-splicing. *Human Molecular Genetics*, vol. 22, no. 13. ISSN 1460-2083. DOI 10.1093/hmg/ddt108.
- AVILA, J., 2009. *The tau code*. 2009. S.l.: s.n.
- BADDELEY, A., 1992. Working memory. *Science*, vol. 255, no. 5044. ISSN 00368075. DOI 10.1126/science.1736359.
- BANCHER, C., BRUNNER, C., LASSMANN, H., BUDKA, H., JELLINGER, K., WICHE, G., SEITELBERGER, F., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K. and WISNIEWSKI, H.M., 1989. Accumulation of abnormally phosphorylated τ precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Research*, vol. 477, no. 1-2. ISSN 00068993. DOI 10.1016/0006-8993(89)91396-6.
- BANKS, S.J., SREENIVASAN, K.R., WEINTRAUB, D.M., BALDOCK, D., NOBACK, M., PIERCE, M.E., FRASNELLI, J., JAMES, J., BEALL, E., ZHUANG, X., CORDES, D. and LEGER, G.C., 2016. Structural and functional MRI differences in master sommeliers: A pilot study on expertise in the brain. *Frontiers in Human Neuroscience*, vol. 10. ISSN 16625161. DOI 10.3389/fnhum.2016.00414.
- BODEA, L.G., ECKERT, A., ITTNER, L.M., PIGUET, O. and GÖTZ, J., 2016. *Tau physiology and pathomechanisms in frontotemporal lobar degeneration*. 2016. S.l.: s.n.

- BOUTER, C. and BOUTER, Y., 2019. 18F-FDG-PET in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Medicine*, vol. 6. ISSN 2296-858X. DOI 10.3389/fmed.2019.00071.
- BUÉE, L., BUSSIÈRE, T., BUÉE-SCHERRER, V., DELACOURTE, A. and HOF, P.R., 2000. *Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders*. 2000. S.l.: s.n.
- CASTILLO-CARRANZA, D.L., GERSON, J.E., SENGUPTA, U., GUERRERO-MUÑOZ, M.J., LASAGNA-REEVES, C.A. and KAYED, R., 2014. Specific targeting of tau oligomers in Htau mice prevents cognitive impairment and tau toxicity following injection with brain-derived tau oligomeric seeds. *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 40, no. S1. ISSN 18758908. DOI 10.3233/JAD-132477.
- CHEN, Z. and ZHONG, C., 2013. *Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies*. 2013. S.l.: s.n.
- CHERRY, S.R. and GAMBHIR, S.S., 2001. Use of Positron Emission Tomography in Animal Research. *ILAR Journal*, vol. 42, no. 3. ISSN 1084-2020. DOI 10.1093/ilar.42.3.219.
- CLAVAGUERA, F., LAVENIR, I., FALCON, B., FRANK, S., GOEDERT, M. and TOLNAY, M., 2013. "Prion-Like" Templated Misfolding in Tauopathies. *Brain Pathology*, vol. 23, no. 3. ISSN 10156305. DOI 10.1111/bpa.12044.
- COPE, T.E., RITTMAN, T., BORCHERT, R.J., JONES, P.S., VATANSEVER, D., ALLINSON, K., PASSAMONTI, L., VAZQUEZ RODRIGUEZ, P., BEVAN-JONES, W.R., O'BRIEN, J.T. and ROWE, J.B., 2018. Tau burden and the functional connectome in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *Brain*, vol. 141, no. 2. ISSN 14602156. DOI 10.1093/brain/awx347.
- DEVANAND, D., MICHAELS-MARSTON, K.S., XINHUA LIU, M., PELTON, G.H., PADILLA, M., KAREN MARDER, M., BELL, K., STERN, Y. and MAYEUX, R., 2000. Olfactory Deficits in Patients With Mild Cognitive Impairment Predict Alzheimer's Disease at Follow-Up. *Am J Psychiatry*. S.l.:
- DOTY, R.L., 2008. *The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: Is it viable?* 2008. S.l.: s.n.
- DOTY, R.L., 2017. *Olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases: is there a common pathological substrate?* 1 June 2017. S.l.: Lancet Publishing Group.
- DOTY, R.L. and KAMATH, V., 2014. *The influences of age on olfaction: A review*. 2014. S.l.: s.n.
- DRUBIN, D.G., CAPUT, D. and KIRSCHNER, M.W., 1984. Studies on the expression of the microtubule-associated protein, tau, during mouse brain development, with newly isolated complementary DNA probes. *Journal of Cell Biology*, vol. 98, no. 3. ISSN 00219525. DOI 10.1083/jcb.98.3.1090.

- DUFF, K., KNIGHT, H., REFOLO, L.M., SANDERS, S., YU, X., PICCIANO, M., MALESTER, B., HUTTON, M., ADAMSON, J., GOEDERT, M., BURKI, K. and DAVIES, P., 2000. Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiology of Disease*, vol. 7, no. 2. ISSN 09699961. DOI 10.1006/nbdi.1999.0279.
- ESPÍNDOLA, S.L., DAMIANICH, A., ALVAREZ, R.J., SARTOR, M., BELFORTE, J.E., FERRARIO, J.E., GALLO, J.M. and AVALE, M.E., 2018. Modulation of Tau Isoforms Imbalance Precludes Tau Pathology and Cognitive Decline in a Mouse Model of Tauopathy. *Cell Reports*, vol. 23, no. 3. ISSN 22111247. DOI 10.1016/j.celrep.2018.03.079.
- FRIEDLAND, R.P., BUDINGER, T.F., GANZ, E., YANO, Y., MATHIS, C.A., KOSS, B., OBER, B.A., HUESMAN, R.H. and DERENZO, S.E., 1983. Regional cerebral metabolic alterations in dementia of the alzheimer type: Positron emission tomography with [18f]fluorodeoxyglucose. *Journal of Computer Assisted Tomography*, vol. 7, no. 4. ISSN 15323145. DOI 10.1097/00004728-198308000-00003.
- FULGA, T.A., ELSON-SCHWAB, I., KHURANA, V., STEINHILB, M.L., SPIRES, T.L., HYMAN, B.T. and FEANY, M.B., 2007. Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nature Cell Biology*, vol. 9, no. 2. ISSN 14657392. DOI 10.1038/ncb1528.
- FUSTER, J.M., 1997. Network memory. *Trends in Neurosciences*, vol. 20, no. 10. ISSN 01662236. DOI 10.1016/S0166-2236(97)01128-4.
- GAGE, G.J., KIPKE, D.R. and SHAIN, W., 2012. Whole animal perfusion fixation for rodents. *Journal of visualized experiments : JoVE*, no. 65. ISSN 1940087X. DOI 10.3791/3564.
- GASPARINI, L., TERNI, B. and SPILLANTINI, M.G., 2007. *Frontotemporal dementia with tau pathology*. 2007. S.l.: s.n.
- GOEDERT, M., CLAVAGUERA, F. and TOLNAY, M., 2010. The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences*, vol. 33, no. 7. ISSN 01662236. DOI 10.1016/j.tins.2010.04.003.
- GOEDERT, M., FALCON, B., CLAVAGUERA, F. and TOLNAY, M., 2014. *Prion-like mechanisms in the pathogenesis of tauopathies and synucleinopathies*. 2014. S.l.: s.n.
- GOEDERT, M. and JAKES, R., 1990. Expression of separate isoforms of human tau protein: Correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO Journal*, vol. 9, no. 13. ISSN 02614189. DOI 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07870.x.
- GOEDERT, M. and SPILLANTINI, M.G., 2017. *Propagation of Tau aggregates Tim Bliss*. 2017. S.l.: s.n.

- GOEDERT, M., SPILLANTINI, M.G., CAIRNS, N.J. and CROWTHER, R.A., 1992. Tau proteins of alzheimer paired helical filaments: Abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron*, vol. 8, no. 1. ISSN 08966273. DOI 10.1016/0896-6273(92)90117-V.
- GOEDERT, M., SPILLANTINI, M.G., POTIER, M.C., ULRICH, J. and CROWTHER, R.A., 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 Journal*, vol. 8, no. 2. ISSN 02614189. DOI 10.1002/j.1460-2075.1989.tb03390.x.
- GOEDERT, M., WISCHIK, C.M., CROWTHER, R.A., WALKER, J.E. and KLUG, A., 1988. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: Identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, no. 11. ISSN 00278424. DOI 10.1073/pnas.85.11.4051.
- GRELAT, A., BENOIT, L., WAGNER, S., MOIGNEU, C., LLEDO, P.M. and ALONSO, M., 2018. Adult-born neurons boost odor–reward association. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 115, no. 10. ISSN 10916490. DOI 10.1073/pnas.1716400115.
- GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., TUNG, Y.C., QUINLAN, M., WISNIEWSKI, H.M. and BINDER, L.I., 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 83, no. 13. ISSN 00278424. DOI 10.1073/pnas.83.13.4913.
- GU, Y., OYAMA, F. and IHARA, Y., 1996. τ Is widely expressed in rat tissues. *Journal of Neurochemistry*, vol. 67, no. 3. ISSN 00223042. DOI 10.1046/j.1471-4159.1996.67031235.x.
- HASEGAWA, M., SMITH, M.J. and GOEDERT, M., 1998. Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Letters*, vol. 437, no. 3. ISSN 00145793. DOI 10.1016/S0014-5793(98)01217-4.
- HAWKES, C., 2006. *Olfaction in neurodegenerative disorder*. 2006. S.l.: s.n.
- HE, H.J., WANG, X.S., PAN, R., WANG, D.L., LIU, M.N. and HE, R.Q., 2009. The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC Cell Biology*, vol. 10. ISSN 14712121. DOI 10.1186/1471-2121-10-81.
- HERSCHMAN, H.R., 2003. Micro-PET imaging and small animal models of disease. *Current Opinion in Immunology*, vol. 15, no. 4. ISSN 09527915. DOI 10.1016/S0952-7915(03)00066-9.
- HUTTON, M., LENDON, C.L., RIZZU, P., BAKER, M., FROELICH, S., HOULDEN, H.H., PICKERING-BROWN, S., CHAKRAVERTY, S., ISAACS, A., GROVER, A., HACKETT, J., ADAMSON, J., LINCOLN, S., DICKSON, D., DAVIES, P., PETERSEN, R.C., STEVENA, M., DE GRAAFF, E., WAUTERS, E., VAN BAREN, J., HILLEBRAND, M., JOOSSE, M., KWON, J.M., NOWOTNY, P., CHE, L.K., NORTON, J., MORRIS, J.C., REED, L.A., TROJANOWSKI, J., BASUN, H.,

- LANNFELT, L., NEYSTAT, M., FAHN, S., DARK, F., TANNENBERG, T., DODD, P.R., HAYWARD, N., KWOK, J.B.J., SCHOFIELD, P.R., ANDREADIS, A., SNOWDEN, J., CRAUFURD, D., NEARY, D., OWEN, F., COSTRA, B.A., HARDY, J., GOATE, A., VAN SWIETEN, J., MANN, D., LYNCH, T. and HEUTINK, P., 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, vol. 393, no. 6686. ISSN 00280836. DOI 10.1038/31508.
- IKEGAMI, S., HARADA, A. and HIROKAWA, N., 2000. Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neuroscience Letters*, vol. 279, no. 3. ISSN 03043940. DOI 10.1016/S0304-3940(99)00964-7.
- ITTNER, L.M., KE, Y.D., DELERUE, F., BI, M., GLADBACH, A., VAN EERSEL, J., WÖLFING, H., CHIENG, B.C., CHRISTIE, M.J., NAPIER, I.A., ECKERT, A., STAUFENBIEL, M., HARDEMAN, E. and GÖTZ, J., 2010. Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell*, vol. 142, no. 3. ISSN 00928674. DOI 10.1016/j.cell.2010.06.036.
- JEGANATHAN, S., VON BERGEN, M., BRUTLACH, H., STEINHOFF, H.J. and MANDELKOW, E., 2006. Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry*, vol. 45, no. 7. ISSN 00062960. DOI 10.1021/bi0521543.
- JUCKER, M. and WALKER, L.C., 2013. *Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases*. 2013. S.l.: s.n.
- JURADO, M.B. and ROSSELLI, M., 2007. *The elusive nature of executive functions: A review of our current understanding*. 2007. S.l.: s.n.
- KLEIN, C., KRAMER, E.M., CARDINE, A.M., SCHRAVEN, B., BRANDT, R. and TROTTER, J., 2002. Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of Fyn kinase with the cytoskeletal protein Tau. *Journal of Neuroscience*, vol. 22, no. 3. ISSN 02706474. DOI 10.1523/jneurosci.22-03-00698.2002.
- KOMURO, Y., XU, G., BHASKAR, K. and LAMB, B.T., 2015. Human tau expression reduces adult neurogenesis in a mouse model of tauopathy. *Neurobiology of Aging*, vol. 36, no. 6. ISSN 01974580. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.002.
- LAZARINI, F., GABELLEC, M.M., MOIGNEU, C., CHAUMONT, F. de, OLIVOMARIN, J.C. and LLEDO, P.M., 2014. Adult neurogenesis restores dopaminergic neuronal loss in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, vol. 34, no. 43. ISSN 15292401. DOI 10.1523/JNEUROSCI.5366-13.2014.
- LEE, V.M.Y., BRUNDEN, K.R., HUTTON, M. and TROJANOWSKI, J.Q., 2011. Developing therapeutic approaches to tau, selected kinases, and related neuronal protein targets. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 1, no. 1. ISSN 21571422. DOI 10.1101/cshperspect.a006437.
- LEE, V.M.Y., GOEDERT, M. and TROJANOWSKI, J.Q., 2001. *Neurodegenerative tauopathies*. 2001. S.l.: s.n.

- LEI, P., AYTON, S., FINKELSTEIN, D.I., SPOERRI, L., CICCOTOSTO, G.D., WRIGHT, D.K., WONG, B.X.W., ADLARD, P.A., CHERNY, R.A., LAM, L.Q., ROBERTS, B.R., VOLITAKIS, I., EGAN, G.F., MCLEAN, C.A., CAPPAL, R., DUCE, J.A. and BUSH, A.I., 2012. Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nature Medicine*, vol. 18, no. 2. ISSN 10788956. DOI 10.1038/nm.2613.
- LI, Z., HALL, A.M., KELINSKE, M. and ROBERSON, E.D., 2014. Seizure resistance without parkinsonism in aged mice after tau reduction. *Neurobiology of Aging*, vol. 35, no. 11. ISSN 15581497. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.001.
- LURIA, A.R., 1964. Neuropsychology in the Local Diagnosis of Brain Damage. *Cortex*, vol. 1, no. 1. ISSN 00109452. DOI 10.1016/s0010-9452(64)80010-1.
- LUZZI, S., SNOWDEN, J.S., NEARY, D., COCCIA, M., PROVINCIALI, L. and LAMBON RALPH, M.A., 2007. Distinct patterns of olfactory impairment in Alzheimer's disease, semantic dementia, frontotemporal dementia, and corticobasal degeneration. *Neuropsychologia*, vol. 45, no. 8. ISSN 00283932. DOI 10.1016/j.neuropsychologia.2006.12.008.
- M E PHELPS, 2000. PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. . Los angeles, California:
- MANDELKOW, E.M. and MANDELKOW, E., 2012. *Biochemistry and cell biology of Tau protein in neurofibrillary degeneration*. 2012. S.l.: s.n.
- MEDINA, M., HERNÁNDEZ, F. and AVILA, J., 2016. *New features about tau function and dysfunction*. 2016. S.l.: s.n.
- MINOSHIMA, S., GIORDANI, B., BERENT, S., FREY, K.A., FOSTER, N.L. and KUHL, D.E., 1997. Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, vol. 42, no. 1. ISSN 03645134. DOI 10.1002/ana.410420114.
- MORICI, J.F., BEKINSCHTEIN, P. and WEISSTAUB, N. v., 2015. *Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents*. 2015. S.l.: s.n.
- MORRIS, M., KNUDSEN, G.M., MAEDA, S., TRINIDAD, J.C., IOANOVICIU, A., BURLINGAME, A.L. and MUCKE, L., 2015. Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature Neuroscience*, vol. 18, no. 8. ISSN 15461726. DOI 10.1038/nn.4067.
- MORRIS, M., MAEDA, S., VOSSEL, K. and MUCKE, L., 2011. *The Many Faces of Tau*. 2011. S.l.: s.n.
- MORRIS, R.G.M., ANDERSON, E., LYNCH, G.S. and BAUDRY, M., 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, vol. 319, no. 6056. ISSN 00280836. DOI 10.1038/319774a0.
- MOSCONI, L., 2005. *Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease: FDG-PET studies in MCI and AD*. 2005. S.l.: s.n.

- NICOLAS, L.B., KOLB, Y. and PRINSSSEN, E.P.M., 2006. A combined marble burying-locomotor activity test in mice: A practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. *European Journal of Pharmacology*, vol. 547, no. 1–3. ISSN 00142999. DOI 10.1016/j.ejphar.2006.07.015.
- O'KEEFE, J. and DOSTROVSKY, J., 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, vol. 34, no. 1. ISSN 00068993. DOI 10.1016/0006-8993(71)90358-1.
- PAGLINI, G., PERIS, L., MASCOTTI, F., QUIROGA, S. and CACERES, A., 2000. Tau protein function in axonal formation. *Neurochemical Research*, vol. 25, no. 1. ISSN 03643190. DOI 10.1023/A:1007531230651.
- PARDINI, M., HUEY, E.D., CAVANAGH, A.L. and GRAFMAN, J., 2009. Olfactory function in corticobasal syndrome and frontotemporal dementia. *Archives of Neurology*, vol. 66, no. 1. ISSN 00039942. DOI 10.1001/archneurol.2008.521.
- PAXINOS, G., FRANKLIN, K.B.J. and FRANKLIN, K.B.J., 2001. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. S.I.: Academic Press. ISBN 0125476361.
- PHELPS, M.E., 2000. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 16. ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.97.16.9226.
- POLYDORO, M., ACKER, C.M., DUFF, K., CASTILLO, P.E. and DAVIES, P., 2009. Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of Tau pathology. *Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 34. ISSN 02706474. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1065-09.2009.
- RAJPUT, A., DICKSON, D.W., ROBINSON, C.A., ROSS, O.A., DÄCHSEL, J.C., LINCOLN, S.J., COBB, S.A., RAJPUT, M.L. and FARRER, M.J., 2006. Parkinsonism, Lrrk2 G2019S, and tau neuropathology. *Neurology*, vol. 67, no. 8. ISSN 00283878. DOI 10.1212/01.wnl.0000240220.33950.0c.
- ROBERTS, R.O., CHRISTIANSON, T.J.H., KREMERS, W.K., MIELKE, M.M., MACHULDA, M.M., VASSILAKI, M., ALHURANI, R.E., GEDA, Y.E., KNOPMAN, D.S. and PETERSEN, R.C., 2016. Association between olfactory dysfunction and amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer disease dementia. *JAMA Neurology*, vol. 73, no. 1. ISSN 21686149. DOI 10.1001/jamaneurol.2015.2952.
- SAHA, P. and SEN, N., 2019. *Tauopathy: A common mechanism for neurodegeneration and brain aging*. 2019. S.I.: s.n.
- SAIZ-SANCHEZ, D., FLORES-CUADRADO, A., UBEDA-BAÑÓN, I., DE LA ROSA-PRIETO, C. and MARTINEZ-MARCOS, A., 2016. *Interneurons in the human olfactory system in Alzheimer's disease*. 1 February 2016. S.I.: Academic Press Inc.
- SANTPERE, G. and FERRER, I., 2009. *LRRK2 and neurodegeneration*. 2009. S.I.: s.n.

- SCHINDOWSKI, K., BRETTEVILLE, A., LEROY, K., BÉCARD, S., BRION, J.P., HAMDANE, M. and BUÉE, L., 2006. Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *American Journal of Pathology*, vol. 169, no. 2. ISSN 00029440. DOI 10.2353/ajpath.2006.060002.
- SHARMA, V.M., LITERSKY, J.M., BHASKAR, K. and LEE, G., 2007. Tau impacts on growth-factor-stimulated actin remodeling. *Journal of Cell Science*, vol. 120, no. 5. ISSN 00219533. DOI 10.1242/jcs.03378.
- SPILLANTINI, M.G. and GOEDERT, M., 2013. *Tau pathology and neurodegeneration*. 2013. S.l.: s.n.
- SPILLANTINI, M.G., MURRELL, J.R., GOEDERT, M., FARLOW, M.R., KLUG, A. and GHETTI, B., 1998. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 13. ISSN 00278424. DOI 10.1073/pnas.95.13.7737.
- STRANG, K.H., GOLDE, T.E. and GIASSON, B.I., 2019. *MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration*. 2019. S.l.: s.n.
- TAI, Y.C., CHATZIOANNOU, A., SIEGEL, S., YOUNG, J., NEWPORT, D., GOBLE, R.N., NUTT, R.E. and CHERRY, S.R., 2001. Performance evaluation of the microPET P4: a PET system dedicated to animal imaging. *Physics in Medicine and Biology*, vol. 46, no. 7. ISSN 0031-9155. DOI 10.1088/0031-9155/46/7/308.
- TASHIRO, K., HASEGAWA, M., IHARA, Y. and IWATSUBO, T., 1997. Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *NeuroReport*, vol. 8, no. 12. ISSN 09594965. DOI 10.1097/00001756-199708180-00029.
- THIBODEAU, M.-P., CHERTKOW, H. and LÉGER, G.C., 2009. An Evolution of the Diagnostic Criteria for Tauopathies. *The Canadian Review of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, vol. 12, pp. 4-9.
- TROJANOWSKI, J.Q., SCHUCK, T., SCHMIDT, M.L. and LEE, V.M.Y., 1989. Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 37, no. 2. ISSN 00221554. DOI 10.1177/37.2.2492045.
- TSIEN, J.Z., HUERTA, P.T. and TONEGAWA, S., 1996. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, vol. 87, no. 7. ISSN 00928674. DOI 10.1016/S0092-8674(00)81827-9.
- VORHEES, C. v and WILLIAMS, M.T., 2006. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, vol. 1, no. 2. ISSN 1754-2189. DOI 10.1038/nprot.2006.116.

- WEINGARTEN, M.D., LOCKWOOD, A.H., HWO, S.Y. and KIRSCHNER, M.W., 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 72, no. 5. ISSN 00278424. DOI 10.1073/pnas.72.5.1858.
- WESSON, D.W., WILSON, D.A. and NIXON, R.A., 2010. Should olfactory dysfunction be used as a biomarker of Alzheimer's disease? *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 10, no. 5. ISSN 1473-7175. DOI 10.1586/ern.10.33.
- WINTERS, B.D., FORWOOD, S.E., COWELL, R.A., SAKSIDA, L.M. and BUSSEY, T.J., 2004. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: Heterogeneity of function within the temporal lobe. *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 26. ISSN 02706474. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1346-04.2004.
- WITMAN, G.B., CLEVELAND, D.W., WEINGARTEN, M.D. and KIRSCHNER, M.W., 1976. Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites (flagella/in vitro assembly/electron microscopy). *Cell Biology*, vol. 73, no. 11.
- YANG, S., KUAN, W.L. and SPILLANTINI, M.G., 2016. Progressive tauopathy in P301S tau transgenic mice is associated with a functional deficit of the olfactory system. *European Journal of Neuroscience*, vol. 44, no. 6. ISSN 14609568. DOI 10.1111/ejn.13333.
- ZHANG, J., 2016. *Olfactory loss-on the road to potential diagnosis criteria of Alzheimer disease*. 2016. S.l.: s.n.
- ZMUDA, J.F. and RIVAS, R.J., 2000. Actin disruption alters the localization of tau in the growth cones of cerebellar granule neurons. *Journal of Cell Science*, vol. 113, no. 15. ISSN 00219533.