**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

# Modulación de la expresión de la proteína asociada a microtúbulos Tau: consecuencias funcionales e implicancias en los procesos neurodegenerativos

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

**Lic. Carolina Lucía Facal**

Directora de tesis: Dra. María Elena Avale

Consejero de estudios: Dr. Flavio De Souza

Lugar de trabajo: Laboratorio de Terapéutica Experimental de los Procesos Neurodegenerativos, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI-CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2025

# AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, quería agradecer a todas las personas que hicieron posible esta tesis. Este trabajo es parte de la colaboración de muchas personas que le dedicaron tiempo, recursos, discusiones, apoyo y sobre todo ganas a que las cosas sigan adelante. Desde un consejo sobre cómo usar un reactivo hasta el análisis de los experimentos. A todos ellos, gracias por formarme y hacerme crecer profesionalmente.

A mi directora, Ele, por transmitirme su pasión por tau, por enseñarme sobre ciencia y también sobre la vida. Por impulsarme a desarrollarme en mi carrera y animarme para que me enfrente a nuevas experiencias. Por las horas eternas viendo membranas de western y festejarme los resultados. Por estar al pie del cañón, aunque sean las 4 de la mañana, esté del otro lado del mundo o se rompa una pata. Gracias por la dedicación y el esfuerzo para que esta tesis y otros proyectos se hayan realizado más allá de las adversidades.

A mi codirector, Tom, por ser una gran persona y mentor, por darme las mini alícuotas de anticuerpos y sobre todo por abrir mi cabeza más allá de los ratones. A Iván, Caye y Trini por los experimentos hechos en neuronas humanas y en muchos casos por las horas de debate previas al paper, los intentos de Tau Clubs y los intercambios de reactivos.

A todos los que colaboraron para que este proyecto de tesis se expanda y pueda enriquecerse mucho más. A Marian Soiza Reilly, por la manija de querer participar en el proyecto y por hacer los ensayos de Array junto con Carla y Rocío. Al otro Marian, Di Guilmi, también por su manija para colaborar que continuará en el futuro, y por su gran mentoría en electrofisiología. A Ezequiel, por todo el trabajo que fue registrar a los animales y hacer los análisis, pero sobre todo por aguantar las largas horas de debates y consultas. A Germán y Leandro, por los ensayos de PET y al grupo de Antonia Marin Burgin por los experimentos de patch-clamp en neuronas humanas.

A mi Chayanne Crew, mi grupo de laboratorio y también mis amigos. Por el apoyo incondicional durante el doctorado, así como en la vida. Por los experimentos que hicieron para esta tesis, por lo fácil que fue compartir con ustedes y por los eternos chismes (siempre con comida de por medio, obviamente).

A mi primer compañero del doctorado, Javi. Por tu eterna paciencia con los ratones, por la conducta, por enseñarme (aunque tardaba diez veces más que vos en todo) y por calmarme en los momentos difíciles. Por los almuerzos puntuales a las 12 y

las charlas de terapia mientras cambiábamos jaulas o nos quedábamos todo el día en el laboratorio en la pandemia.

A Indi, por traer orden al laboratorio, por tu capacidad y tu predisposición para todo. Por abrirme las puertas de tu casa en Tucumán sin vueltas, por cantar “Hombres de acción” y varias canciones latinas juntas, y por traer a San Chayanne a nuestras vidas.

A Clari, alias CG, por traer la simpatía y el drama al laboratorio, para compensar un poco el grupo. Por compartir el mismo gusto por el vino, por traer las clases de cerámica como forma de terapia y por no bajar los brazos para que me haga hincha del rojito.

A Rami, quien fue en su momento mi pollo, pero ahora hace mejores westerns que yo. Por tu perseverancia, por tus asados y por darnos buenas anécdotas con las qPCRs en tus comienzos. Al resto de lo que fue en su momento el TEPN, a Anita por enseñarme a dar mis primeros pasos en la ciencia y a Carito Lell por su manejo con los ratones, sus consejos sobre la vida y sobre todo por sus excelentes chismes.

A Franchale: Javi, Indi, CG, Flor, Lari, Lady, La Flor, Maru, Sofi, Rami, Nacho, Tomi, Gonza, Eque y Nahue, por las risas, por hacer los días más llevaderos en el laboratorio, por las cremonas y los mates, los chismes, las juntadas, los viajes y por la amistad más allá del laboratorio. Los quiero mucho y va a ser difícil no compartir de la misma forma con ustedes. Mi mención especial para Flor, la artista y ministra de magia, por abrirnos las puertas de su mansión siempre que lo necesitáramos, por sus charlas de psicología y por ser la fotógrafa del grupo. También para Lady por las charlas cuando volvíamos juntas del laboratorio y sus arepas. Por último, para La Flor, por revivir las juntadas más allá de las dificultades económicas y nuestras charlas de apoyo moral.

Al 222, el laboratorio al que entré en el 2018 y siempre fui recibida de la mejor manera. Los integrantes fueron cambiando, pero la buena energía nunca. Quería mencionar especialmente a Mica por ayudarme desde el día 1 con los westerns y prestarme sus reactivos cuando mis geles fallaban, a Fati por las charlas en el cuarto de cultivo y a Arthur por su ayuda de siempre con la biología molecular y la burocracia.

A Cami, mi amiga de la facultad, que se volvió como una hermana para mí en estos años. Por la amistad desde el CBC en Agronomía, hasta las juntadas en los primeros años de nuestros doctorados cuando éramos inocentes y nos fascinaba la neurociencia, por las horas analizando resultados y leyendo papers.

A mi vieja, Lucre, por escucharme hablar de lo que hago con la misma paciencia que en aquellos días en los que volvía de las clases de IBMC y le contaba emocionada lo que había aprendido, por tratar siempre de querer entenderlo. Desde los dibujitos sobre cómo funcionan las hormonas hasta mostrarme un laboratorio por primera vez. Gracias por estar siempre y por tu cariño incondicional.

A mi viejo, Guille, por despertarme el interés de querer entender cómo funciona el mundo y regalarme libros de ciencia, aunque ni siquiera sé si alguna vez voy a llegar a leerlos a todos. Por los debates eternos sobre política y la indignación constante por la situación de la ciencia y la educación en la Argentina. Gracias por enseñarme sobre la pasión de dedicarle tiempo a las cosas que a uno le gustan y lo gratificante que puede ser.

A mis amigas de toda la vida, Pau, Aldi, Ale y Debi. Gracias por sostener siempre, por la amistad incondicional y por estar presentes en cualquier circunstancia. Por la escucha, las juntadas, las risas, las crisis y por sentir que nunca pasan los años para nuestra amistad, incluso estando en la otra punta del mundo.

Por último, quería agradecer a las instituciones que hicieron que esta tesis fuera posible. En primer lugar, al CONICET, por mi beca doctoral y por ser la institución más importante que representa a la ciencia argentina. Al INGEBI, mi instituto durante 8 años, donde no sólo pude acceder al equipamiento necesario para realizar mis experimentos, sino también donde me siento como en casa, un lugar en el que conocí a muchas personas increíbles y muy importantes para mí a lo largo de estos años. A las organizaciones que financiaron el proyecto, como la Agencia y CurePSP, así como aquellas que permitieron que pueda tener mis experiencias en el exterior, como la IBRO y la ISN. A la Universidad de Buenos Aires, por la educación pública y de calidad, por haberme formado por tantos años desde que entré al CBC, y por darme el privilegio de poder cursar en la hermosa FCEN. Quizás en este contexto distópico ya los agradecimientos y la felicidad de aquello vivido se transformen en deseos, en anhelos de que las instituciones estatales dedicadas a la ciencia y a la educación sigan existiendo en mi país. Vivan la ciencia y la educación pública por siempre, gracias por ser parte de lo que soy hoy no sólo como profesional, sino también como ser humano.

# ÍNDICE

**RESUMEN** ..... **7**

**ABSTRACT** ..... **8**

**INTRODUCCIÓN** ..... **10**

1. Fisiología de tau ..... 12

Organización génica y proteica de tau ..... 12

Funciones fisiológicas de tau ..... 15

2. Fisiopatología de tau ..... 18

Variantes patogénicas en el gen *MAPT* ..... 18

Hiperfosforilación de tau ..... 19

Acumulación patológica de tau ..... 20

Propagación tipo-priónica y trans-sináptica de tau ..... 23

Rol de tau patológica asociada a la actividad eléctrica y al segmento inicial del axón ..... 25

Mecanismos de vulnerabilidad selectiva en taupatías ..... 29

3. Modelos murinos de taupatía ..... 32

El modelo htau ..... 32

4. Estrategias terapéuticas para las taupatías ..... 33

El ARN mensajero de *MAPT* como blanco terapéutico: ventajas y desventajas ..... 35

Estrategia de microARNs artificiales y su expresión mediante vectores virales ..... 37

**HIPOTESIS DE TRABAJO** ..... **40**

**OBJETIVO GENERAL DE TRABAJO** ..... **40**

**RESULTADOS** ..... **41**

1. Análisis y validación de los Tau-miRNAs en modelos neuronales en cultivo ..... 41

*Screening* de los Tau-miRNAs en células SH-SY5Y ..... 41

Validación de la eficiencia de los Tau-miRNAs en neuronas humanas *in vitro* derivadas de células madre pluripotentes inducidas (hiPSC) ..... 42

Análisis del efecto de los Tau-miRNAs: morfología y transporte axonal ..... 44

Análisis del efecto de los Tau-miRNAs: actividad eléctrica y posición del segmento inicial del axón ..... 45

2. Caracterización del curso temporal de fenotipos moleculares, electrofisiológicos, metabólicos y comportamentales en el ratón htau como modelo murino de taupatía ..... 48

Curso temporal de fenotipos cognitivos ..... 49

Curso temporal de la captación de 18F-FDG por microPET ..... 51

Curso temporal de registros electrofisiológicos de campo en la corteza prefrontal ..... 52

Caracterización de los niveles de tau insoluble en la corteza prefrontal ..... 53

3. Evaluación de los Tau-miRNAs como herramienta terapéutica en el modelo murino de taupatía htau ..... 56

3.A. Tratamiento temprano y sitio-específico de tau mediante los Tau-miRNAs en el ratón htau para la prevención del desarrollo de fenotipos asociados a taupatías ..... 56

Evaluación de los fenotipos conductuales, metabólicos y electrofisiológicos del ratón htau por el tratamiento temprano con los Tau-miRNAs en la corteza prefrontal ..... 57

Análisis del efecto del tratamiento temprano con los Tau-miRNAs sobre la acumulación patológica de tau en la corteza prefrontal del ratón htau ..... 62

3.B. Rescate fenotípico en el ratón htau a través del tratamiento sitio-específico con los Tau-miRNAs ..... 67

Evaluación del rescate fenotípico conductual y electrofisiológico en el ratón htau luego del tratamiento tardío con los Tau-miRNAs en la corteza prefrontal ..... 68

Análisis del efecto del tratamiento tardío con los Tau-miRNAs en los niveles de tau patológica en la corteza prefrontal del ratón htau ..... 74

**DISCUSIÓN ..... 77**

1. Consecuencias funcionales del silenciamiento de tau en neuronas humanas *in vitro* derivadas de células madre pluripotentes inducidas ..... 79

2. Consecuencias funcionales de la acumulación patológica de tau ..... 81

3. Implicancias del silenciamiento de tau en procesos neurodegenerativos ..... 85

4. Silenciamiento de tau dirigido a regiones vulnerables en taupatías: perspectivas y desafíos futuros ..... 90

**CONCLUSIONES ..... 95**

**ANEXO 1 ..... 96**

**MATERIALES Y MÉTODOS ..... 97**

1. Diseño de microARNs y empaquetado en vectores lentivirales ..... 97

Diseño de los microARNs artificiales contra tau. ..... 97

Vectores lentivirales. ..... 98

2. Experimentos en cultivo ..... 98

*Screening* de los microARNs contra tau. ..... 98

Cultivo de hiPSCs y diferenciación neuronal. ..... 99

Transducción y transfección de neuronas derivadas de hiPSCs. ..... 100

Aislamiento de ARN de neuronas en cultivo y detección del ARN mensajero de tau total. ..... 100

Análisis de Scholl. ..... 101

*Live-cell imaging* y análisis del transporte axonal. ..... 101

Registros electrofisiológicos de neuronas en cultivo. ..... 102

Detección y análisis del segmento inicial del axón (AIS). ..... 102

3. Experimentos en el modelo htau ..... 103

Ratones y diseño experimental. ..... 103

Inyecciones estereotáxicas. ..... 104

Batería de ensayos de comportamiento. ..... 104

Tomografía de emisión de positrones (microPET). ..... 105

Registros electrofisiológicos de campo *in vivo*. ..... 106

*Array Tomography* seguido de inmunofluorescencia. ..... 107

Extracción de proteínas y Western blot. ..... 108

Ensayo de insolubilidad de sarkosyl para tau. ..... 109

4. Análisis estadísticos ..... 109

**BIBLIOGRAFIA ..... 110**

# RESUMEN


**Modulación de la expresión de la proteína asociada a microtúbulos Tau: consecuencias funcionales e implicancias en los procesos neurodegenerativos**

La acumulación de la proteína tau patológica es un marcador de múltiples enfermedades neurodegenerativas, conocidas como taupatías, que incluyen la enfermedad de Alzheimer, la demencia frontotemporal y la parálisis supranuclear progresiva. Dada la gran diversidad de mecanismos mediante los cuales la disfunción de esta proteína puede alterar la fisiología neuronal, las estrategias que se dirigen a reducir los niveles de tau resultan intervenciones terapéuticas prometedoras. Sin embargo, se requiere de terapias más precisas que puedan dirigirse a núcleos específicos afectados por la enfermedad, evitando así el silenciamiento global de tau en el cerebro.

En este proyecto, se utilizaron microARNs artificiales (amiRNAs) dirigidos contra el ARN mensajero humano de *MAPT* para silenciar de manera estable la proteína tau (Tau-miRNAs) mediante su intervención en la vía endógena de interferencia del ARN (ARNi). En cultivos de neuronas humanas diferenciadas, la reducción en los niveles de tau mediada por microARNs disminuyó la actividad eléctrica sin afectar sustancialmente la morfología neuronal ni el transporte axonal. En un modelo murino de taupatía, el ratón htau, se expresaron localmente los Tau-miRNAs en la corteza prefrontal (PFC), una zona particularmente vulnerable al inicio de la patología tau en este modelo. Para determinar la evolución fenotípica en los ratones htau, estos animales fueron evaluados a lo largo del tiempo mediante ensayos comportamentales, de imágenes, electrofisiológicos y bioquímicos. Luego, se realizaron las inyecciones de los Tau-miRNAs antes y después del inicio de los fenotipos en el modelo htau en diferentes cohortes de ratones. El silenciamiento mediado por los Tau-miRNAs redujo la acumulación de tau insoluble e hiperfosforilada, moduló la actividad de las neuronas corticales y mejoró la captación de glucosa en la PFC. Además, dicho silenciamiento revirtió el deterioro cognitivo en ratones htau envejecidos.

Los resultados obtenidos sugieren que el uso de los Tau-miRNAs puede reducir la patología tau de forma eficaz, proporcionando una prueba de concepto para el desarrollo de un potencial enfoque terapéutico basado en el silenciamiento localizado de tau para rescatar los fenotipos asociados a las taupatías.



**Palabras clave:** tau, taupatías, vulnerabilidad selectiva, microARNs artificiales, ARNi, terapia génica.

# ABSTRACT


**Modulation of the expression of microtubule associated protein Tau: functional consequences and implications in neurodegenerative processes**

The accumulation of pathological tau protein is a hallmark of several neurodegenerative diseases, known as tauopathies, including Alzheimer's Disease, frontotemporal dementia, and progressive supranuclear palsy. Given the great diversity of mechanisms by which tau dysfunction can alter neuronal physiology, strategies aimed at reducing tau are promising therapeutic interventions. Yet, more precise therapies would require targeting specific nuclei affected by the disease while avoiding global tau silencing over the brain.

In this project, artificial microRNAs (amiRNAs) directed against the human *MAPT* mRNA were tested to stably silence tau protein (Tau-miRNAs) by engaging the endogenous RNA interference pathway (RNAi). In human differentiated neurons in culture, microRNA-mediated tau reduction diminished firing activity without impairing neuronal morphology nor axonal transport. In the htau mouse model of tauopathy, Tau-miRNAs were locally expressed in the prefrontal cortex (PFC), an area particularly vulnerable to initiate tau pathology in this model. To determine phenotypic progression in htau mice, these animals were assessed over time using behavioural, imaging, electrophysiological and biochemical analyses. Next, Tau-miRNAs injections were performed before and after phenotypic onset in the htau model in different cohorts of mice. Tau-miRNAs-mediated knockdown reduced the accumulation of insoluble and hyperphosphorylated tau, modulated firing activity of cortical neurons, and improved glucose uptake in the PFC. Moreover, such reduction reverted cognitive decline in aged htau mice.

These results suggest that the use of Tau-miRNAs can effectively reduce tau pathology, providing a proof of concept for the development of a potential therapeutic approach based on local tau knockdown to rescue tauopathy-related phenotypes.



**Key words:** tau, tauopathies, selective vulnerability, artificial microRNAs, RNAi, gene therapy.

## Algunos de los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en:

- Facal CL, Fernández-Bessone I, Muñiz JA, Pereyra AE, Pedroncini O, Páez-Paz I, Clerici-Delville R, Arnaiz C, Urrutia L, Falasco G, Argañaraz CV, Saez T, Marin-Burgin A, Soiza-Reilly M, Falzone T, Avale ME. (2024). Tau reduction with artificial microRNAs modulates neuronal physiology and improves tauopathy phenotypes in mice. *Molecular Therapy*, 4:1080-1095.

- Muñiz JA*, Facal CL*, Urrutia L, Clerici-Delville R, Damianich A, Ferrario JE, Falasco G, Avale ME. (2022). SMaRT regulation of tau isoforms rescues cognitive and motor impairments in a preclinical model of tauopathy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10:951384.

- Avale, ME (2023). MicroRNAs designed against the microtubule-associated protein tau for the treatment of tauopathies. (WO 2025/027577). *World Intellectual Property Organization.*

# INTRODUCCIÓN

La proteína asociada a microtúbulos tau juega un papel crítico en la homeostasis y función neuronal (Arendt et al., 2016). La función normal de tau depende de un preciso control de su síntesis, la cual involucra diversos mecanismos regulatorios pre y postranscripcionales, así como de múltiples modificaciones postraduccionales. Un metabolismo anormal de esta proteína deriva en un tipo particular de enfermedades neurodegenerativas denominadas taupatías, que se caracterizan por la presencia de agregados intracelulares de tau. Dentro de las mismas se pueden encontrar la Enfermedad de Alzheimer (EA) y las llamadas taupatías primarias como la demencia frontotemporal (FTD), la parálisis supranuclear progresiva (PSP) y la degeneración corticobasal (CBD), entre otras (Figura 1) (Ballatore et al., 2007; Götz et al., 2019). Las consecuencias de estas patologías son la muerte neuronal progresiva y la presencia de signos clínicos de demencia o disfunción motora en los pacientes que las padecen. Según la Organización Mundial de la Salud, en el año 2021 se han reportado 57 millones de casos de demencia a nivel global, siendo la EA la más prevalente, representando el 60-70% de los casos. Luego le siguen la demencia vascular, la demencia con cuerpos de Lewy y por último la degeneración frontotemporal lobar (FTLD). Esta última se caracteriza por la degeneración de los lóbulos frontales y temporales, a partir de la cual se pueden discriminar 3 variantes que se diferencian en sus signos clínicos y regiones afectadas (Rabinovici y Miller, 2010; Forrest et al., 2019). Algunas de estas variantes se solapan clínicamente con parkinsonismos atípicos, que incluyen a la PSP, CBD y la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), afectando la función motora. La mayoría de las variantes de FTLD se caracterizan por la presencia de agregados de tau (FTLD-tau), aunque hay otras proteínas como TDP-43 y FUS que pueden estar implicadas en esta enfermedad.

Si bien la acumulación de formas patológicas de tau es el denominador común de las taupatías, existen variantes en la etiología de estas enfermedades neurodegenerativas que pueden ubicarse en cualquiera de los estadios de la producción de esta proteína, desde un origen genético hasta incluso a nivel postraduccional (Arendt et al., 2016). Además, en cada tipo de taupatía varían tanto los agregados insolubles de tau que se pueden formar (Götz et al., 2019), como las regiones cerebrales y los subtipos neuronales —y en algunos casos, gliales— que pueden encontrarse afectados (Fu et al., 2018; Forrest et al., 2019). Debido a esto último, en estas patologías, ciertas regiones del cerebro serán aquellas que se encuentren primariamente comprometidas, y conducirán a la manifestación de los signos clínicos más predominantes en los pacientes. Estos síntomas pueden ser la pérdida de la memoria como en la EA, cambios

en el comportamiento y en el lenguaje como en la FTD o la disfunción motora como en la PSP y la CBD. A partir de estas áreas primariamente afectadas, se iniciará un mecanismo de propagación de tau patológica de célula a célula a partir de regiones sinápticamente conectadas (Dujardin y Hyman, 2019, pp. 305-326; Colin et al., 2019), con un patrón regional particular según la taupatía (Colin et al., 2019; Franzmeier et al., 2020, 2022), que tendrá como consecuencia la pérdida de la autonomía del paciente y su muerte. Aunque se han hecho grandes esfuerzos por tratar los síntomas o intentar frenar el avance de estos, no existen tratamientos que detengan el proceso neurodegenerativo, mediado por la formación de formas patológicas de tau.

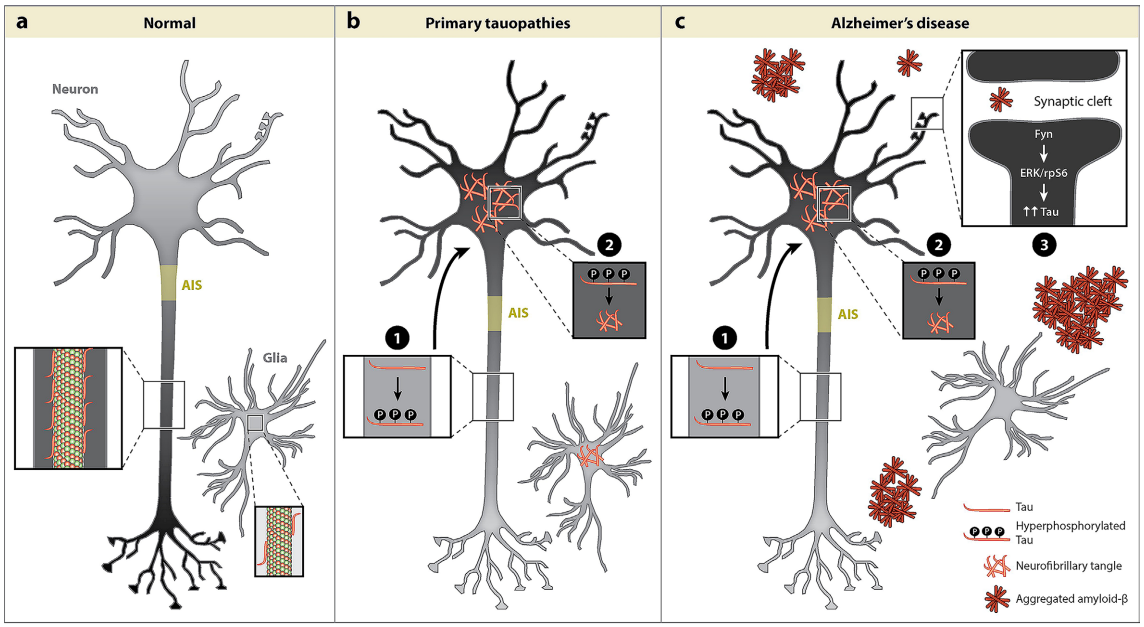



**Figura 1: Patología de tau en taupatías primarias y en la enfermedad de Alzheimer. a.** En condiciones normales, tau se encuentra mayormente asociada a los microtúbulos en los axones de las neuronas y presenta una baja expresión en la glía. **b.** En las taupatías primarias, tau se hiperfosforila (1) y se acumula en el compartimento somatodendrítico (2), formando agregados insolubles que varían según la patología. También puede haber acumulación patológica en la glía. **c.** Para la enfermedad de Alzheimer, en general los pasos 1 y 2 son similares a las taupatías primarias, aunque en este caso hay además acumulación extracelular de Aβ, que favorecería la producción de tau (3) y presenta otras consecuencias patológicas. En la EA, no hay acumulación de tau en glía. *Adaptado de Götz et al., 2019.*

Ante la gran diversidad de mecanismos mediante los cuales la disfunción de tau puede alterar la fisiología neuronal, la reducción de tau patológica representa hasta el día de hoy la estrategia más promisoria para el desarrollo de una terapia eficaz capaz de combatir este tipo de enfermedades (Chang, Shao, et al., 2021). El objetivo de este trabajo consiste en estudiar las consecuencias funcionales y potencialmente terapéuticas de silenciar los niveles de producción de la proteína tau de forma sitio-específica a partir del uso de microARNs artificiales.

## 1. Fisiología de tau

La proteína tau es una proteína intrínsecamente desordenada que pertenece a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs, por sus siglas en inglés). Es codificada por el gen *MAPT* y se expresa en mayor abundancia en el cerebro (Arendt et al., 2016). Está asociada principalmente a los axones, aunque también se la puede encontrar en el compartimento somatodendrítico, en las sinapsis y en el núcleo. Además, se puede producir en menor cantidad en astrocitos y oligodendrocitos, así como en tejido no neuronal como por ejemplo en músculo, corazón, testículos, pulmones, entre otros (Arendt et al., 2016).

### Organización génica y proteica de tau

La proteína tau se encuentra codificada únicamente por el gen *MAPT* que presenta 16 exones en el cromosoma humano 17q21.31 (Figura 2). Se han descripto dos haplotipos posibles en poblaciones de descendencia europea que varían en la presencia de una inversión de aproximadamente 900 kb (H1) o la ausencia de esa inversión (H2). La herencia del haplotipo H1, así como su presencia en homocigosis predisponen a un mayor riesgo de contraer PSP, CBD, entre otras enfermedades neurodegenerativas (Arendt et al., 2016).

En el cerebro humano adulto, la expresión de *MAPT* produce 6 isoformas posibles que se forman por el *splicing* alternativo de los exones 2, 3 y 10 (Figura 2) (Arendt et al., 2016). Todas las isoformas de tau están conformadas por las siguientes regiones proteicas: el extremo N-terminal, una región rica en prolinas, la región de unión a microtúbulos y el extremo C-terminal. El extremo N-terminal puede variar en sus repeticiones, ya que el *splicing* alternativo de los exones 2 y 3 da las isoformas 0N (sin exón 2 y 3), 1N (sólo exón 2) y 2N (exón 2 y 3). Por otro lado, la región de unión a microtúbulos se encuentra formada por repeticiones consecutivas que se encuentran codificadas por los exones 9-12, por lo que la ausencia o presencia del exón 10 dará las isoformas con 3 repeticiones (3R) o 4 repeticiones (4R), respectivamente. Se calcula aproximadamente que en el cerebro humano adulto la producción de las isoformas 3R y 4R es equimolar, mientras que las isoformas 1N y 0N son las que prevalecen con respecto a la 2N.

El *splicing* alternativo de los exones 2, 3 y 10 es un proceso altamente regulado dependiente del tipo de tejido, así como del estadio del desarrollo. Por ejemplo, la isoforma 3R0N es la única que se expresa en el cerebro en el desarrollo de humanos y ratones, mientras que en el adulto se produce un cambio hacia la integración del exón 10. Este cambio en la producción de isoformas con distinta cantidad de repeticiones de

unión a microtúbulos, y por lo tanto diferente afinidad a los mismos, tendría como consecuencia la reestructuración morfológica y funcional que permitiría el pasaje de un cerebro en desarrollo hacia uno adulto a través de mecanismos como la sinaptogénesis y el crecimiento neural. En ratas se ha demostrado que el cambio hacia la producción de la isoforma 4R coincide con la formación de las sinapsis, representando un momento crítico en el desarrollo de la corteza motora y sensorial (Arendt et al., 2016).

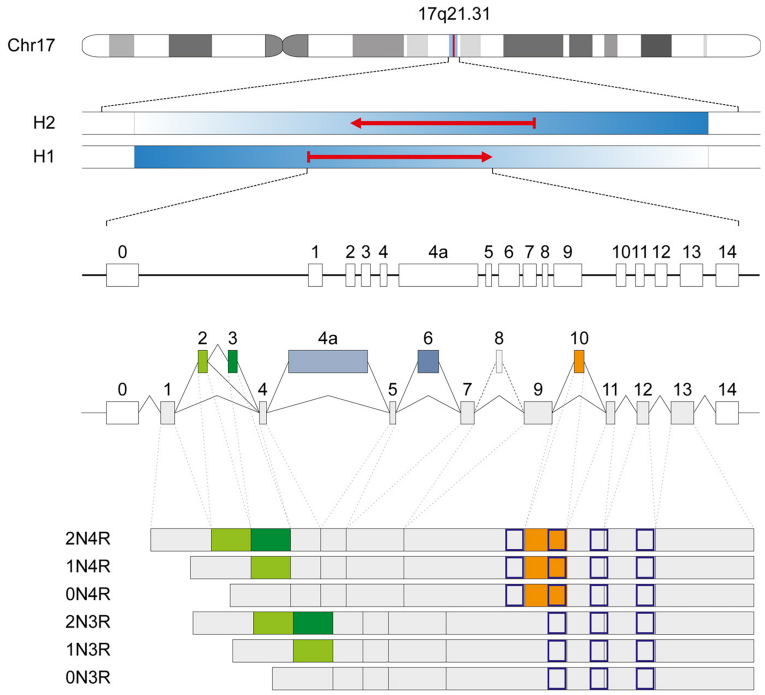



**Figura 2: Organización génica, expresión y *splicing* alternativo de *MAPT*.** El gen *MAPT* humano se ubica en el cromosoma 17, presenta dos haplotipos detectados en la población (H1 y H2) y está formado por 16 exones. A partir de la expresión de *MAPT*, el ARN mensajero se procesará en el cerebro humano adulto dando 6 isoformas proteicas posibles, que derivan del *splicing* alternativo de los exones 2, 3 y 10. *Adaptado de Arendt et al., 2016*.

La estructura proteica de tau es de carácter altamente soluble, de conformación intrínsecamente desordenada, con poca estructura secundaria (Uversky, 2015). La región N-terminal de tau interactúa con proteínas como la anexina 2 y componentes de la membrana, aunque también actúa como espaciador entre los microtúbulos por impedimento estérico. La región rica en prolinas forma parte del dominio de proyección y es la encargada de interactuar con diversas proteínas, participando en procesos de señalización celular. La región de unión a microtúbulos permite regular la dinámica de interacción de tau con los microtúbulos, pero también es capaz de interactuar con otras proteínas como la actina, la apolipoproteína E, distintas fosfatasas de tau, hasta incluso con el ADN. Como se mencionó anteriormente, presenta tres o cuatro repeticiones de unión a microtúbulos según el *splicing* alternativo del exón 10. Por último, la región C-

terminal regula la interacción de tau con los microtúbulos y con componentes de la membrana plasmática (Figura 3) (Arendt et al., 2016).

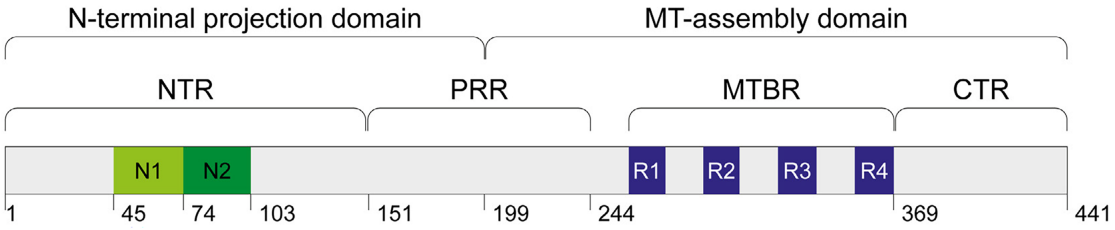



**Figura 3: Organización proteica de tau.** La proteína tau se conforma por 4 regiones: la región N-terminal (NTR) que contiene a las regiones N1 y N2 que provienen del *splicing* alternativo de los exones 2 y 3, la región rica en prolinas (PRR), la región de unión a microtúbulos que está compuesta por 3 o 4 repeticiones que derivan del *splicing* alternativo del exón 10, y la región C-terminal. En este caso se muestra la proteína en su conformación más larga, la isoforma 4R2N. A su vez, se puede dividir a tau en dos dominios: dominio de proyección N-terminal y dominio de unión a microtúbulos. *Adaptado de Arendt et al., 2016*.

Tau puede estar regulada también a partir de modificaciones postraduccionales (PTMs), que pueden ser la fosforilación, acetilación, metilación, glicosilación, isomerización, O-GlcNAcilación, nitración, SUMOilación, ubiquitinación, el truncamiento, entre otras (Figura 4) (Guo et al., 2017). La fosforilación de tau es la PTM más frecuente, ya que la isoforma más larga de esta proteína (4R2N) presenta 45 serinas, 35 treoninas y 5 tirosinas que pueden ser modificadas. Además, la mayoría de estas se encuentran flanqueando la región de unión a microtúbulos (Arendt et al., 2016). Esto hace que el estado de fosforilación de tau tenga un gran impacto en su conformación y por lo tanto en su fisiología. Por ejemplo, la fosforilación de determinados residuos permite regular la dinámica de unión de tau a los microtúbulos de forma fisiológica y por lo tanto su localización subcelular. A su vez, se ha observado que la fosforilación de tau aumenta en el desarrollo embrionario del cerebro y que existen fosforilaciones reversibles en casos de hibernación y en distintos modelos de desbalance metabólico (Arendt et al., 2016). Sin embargo, la presencia de ciertos residuos fosforilados o un exceso de fosforilaciones (proceso conocido comúnmente como hiperfosforilación de tau) se encuentran asociados a taupatías. Sumado a esto último, se han descripto otras PTMs patológicas como determinadas acetilaciones, glicosilaciones o formas de tau truncada (Colin et al., 2019).

Por la naturaleza de la estructura de tau, esta proteína presenta la capacidad de experimentar separación de fase líquido-líquido, por lo que podría formar biocondensados reversibles como los que se suelen observar para el caso de las proteínas de unión al ARN (Wegmann et al., 2018). Esto ocurre también para otras proteínas asociadas a enfermedades neurodegenerativas como FUS, TDP-43 y hnRNPA1, las cuales presentan dominios de baja complejidad que son aquellos que

desencadenan su proceso de separación de fase (King et al., 2012). Sin embargo, tau no presenta de forma clara alguno de estos dominios ni se conocen cuáles son los mecanismos que dirigen su agregación patológica.

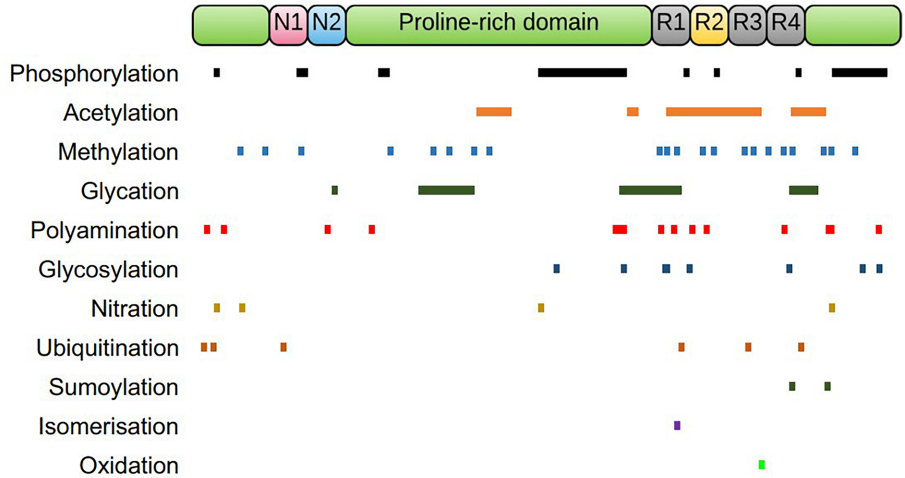



**Figura 4: Modificaciones postraduccionales fisiológicas y patológicas en la proteína tau.** Dentro de estas modificaciones, la fosforilación es la más frecuente, siendo particularmente clave en procesos patológicos. Sin embargo, ciertas fosforilaciones son necesarias para procesos fisiológicos de tau, que regulan su interacción con microtúbulos o con otras proteínas. *Adaptado de Guo et al., 2017.*

## Funciones fisiológicas de tau

Al encontrarse dentro de la familia de las MAPs, siempre se consideró que la función canónica de tau es la estabilización de los microtúbulos. A partir de esta interacción, derivan funciones fundamentales para las neuronas como mantener la integridad de los axones y la morfología neuronal, así como participar en el transporte axonal. Si bien esto ha sido aceptado ampliamente por la comunidad científica a partir de los resultados obtenidos en los primeros trabajos *in vitro* (Weingarten et al., 1975; Drubin et al., 1986; Trinczek et al., 1995), diversas investigaciones a lo largo del tiempo han ido desafiando esta idea. Experimentos posteriores sugirieron que tau no estaría encargada de estabilizar a los microtúbulos, sino más bien de regular su dinámica (Qiang et al., 2018). Adicionalmente, la ablación genética de tau ha sido bien tolerada en ratones (Roberson et al., 2007; Ittner et al., 2010; Gheyara et al., 2014; Bi et al., 2017; Tai et al., 2020), así como su silenciamiento en el cerebro adulto de ratones, primates no humanos y humanos (DeVos et al., 2013, 2017; Mummery et al., 2023).

Con respecto al transporte axonal, se ha descripto que tau puede interferir diferencialmente en los mecanismos que generan la unión de los motores moleculares a los microtúbulos (Ebneth et al., 1998; Dixit et al., 2008) y regular el transporte de moléculas de señalización, factores tróficos e incluso organelas celulares como las mitocondrias o vesículas (Ballatore et al., 2007). Se ha demostrado que tau podría

ejercer un efecto significativamente mayor sobre la procesividad del motor molecular kinesina-1 comparada con el efecto sobre la dineína (Dixit et al., 2008). Este efecto diferencial en la regulación de motores, inicialmente propuesto en modelos *in vitro,* fue posteriormente validado en estudios de dinámicas de transporte analizadas a partir de neuronas humanas en cultivo que presentaban cambios en el contenido de isoformas 3R y 4R de tau (Lacovich et al., 2017). Este trabajo, ha demostrado un efecto significativo de tau sobre el transporte anterógrado de vesículas de la proteína precursora de amiloide (APP), en comparación con el transporte retrógrado. Asimismo, esta regulación en el transporte axonal depende de ciclos frecuentes de unión y de separación de tau de los microtúbulos, mecanismo que estaría determinado por quinasas y fosfatasas de esta proteína. Sin embargo, otros trabajos han demostrado que la ablación genética o el silenciamiento de tau no generó cambios en el transporte axonal de cultivos neuronales primarios (Vossel et al., 2010; 2015) o en los nervios ópticos de ratones (Yuan et al., 2008). Si bien los modelos *Mapt*$^{-/-}$ utilizados podrían presentar compensaciones a partir de la sobrexpresión de otras MAPs, lo que podrían enmascarar los fenotipos observados, estos hallazgos sugieren que tau presenta otras funciones relevantes en la fisiología neuronal más allá de su rol en el transporte axonal.

Una de las funciones de tau que fue adquiriendo mayor relevancia en las últimas dos décadas es su rol como proteína de andamiaje (o *scaffold* en inglés), permitiendo regular la localización subcelular de proteínas asociadas y por lo tanto modulando determinados mecanismos de señalización (Morris et al., 2011). Si bien tau se encuentra en mayor abundancia en los axones, se ha descripto también un rol funcional en las dendritas, en particular a través de su interacción con Fyn, una quinasa de la familia Src (Figura 5). En condiciones normales, tau puede encontrarse en el compartimento somatodendrítico, donde interactúa con Fyn mediante su dominio de proyección y la "conduce" hacia la densidad postsináptica, formando un complejo con la proteína PSD95. Una vez allí, Fyn tiene la capacidad de fosforilar la subunidad NR2B del receptor de NMDA. Esta fosforilación favorece la interacción y el acoplamiento del receptor de NMDA con PSD95, promoviendo la activación de vías de señalización río abajo que resultan tóxicas para las neuronas (Ittner et al., 2010; A. Ittner e Ittner, 2018). Se ha demostrado que estos mecanismos de excitotoxicidad dependen de los niveles de Fyn (Chin et al., 2004, 2005).

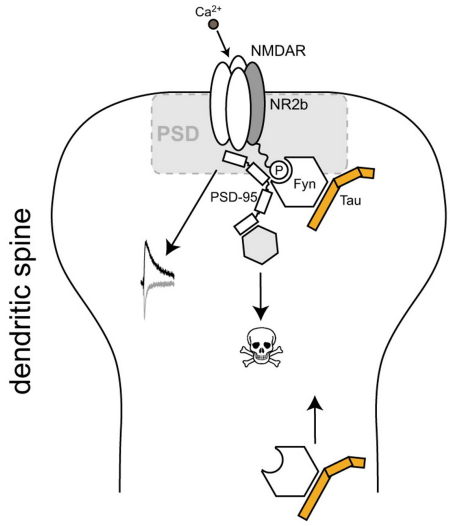



**Figura 5: Función de tau en la densidad postsináptica.** La proteína tau presente en el compartimento somatodendrítico interacciona con la quinasa Fyn dirigiéndola hacia la densidad postsináptica (caja gris). La interacción de este complejo a través de un dominio de la proteína PSD95 permite la fosforilación mediada por Fyn de la subunidad NR2b del receptor de NMDA. Esto favorece la interacción entre el receptor y PSD95, aumentando su estabilidad e induciendo vías de excitotoxicidad. *Adaptado de Ittner et al., 2010*.

Otro de los roles que resultan interesantes para tau es su participación en la fisiología y plasticidad sináptica. Si bien distintos trabajos han tenido resultados a favor y en contra de la función de esta proteína en la plasticidad (Chang, Shao, et al., 2021), registros de *patch-clamp* en la corteza somatosensorial de ratones *Mapt*$^{-/-}$ han demostrado que la ablación genética de tau afecta de forma diferencial la actividad de las neuronas excitatorias en comparación con las inhibitorias (Chang, Evans, et al., 2021). Esto presenta como consecuencia alteraciones en las oscilaciones de redes neuronales, lo que indicaría que tau interviene en el mantenimiento y regulación de las ondas cerebrales. Además, se ha observado que una mayor actividad eléctrica en las neuronas promueve la liberación de tau en modelos *in vitro* e *in vivo* (Pooler et al., 2013; Yamada et al., 2014; Wu et al., 2016), mecanismo clave en el contexto de excitotoxicidad en determinadas patologías neurológicas.

Por último, algunos autores han determinado que tau es esencial para funciones como la locomoción y la memoria, mientras que otros han demostrado que la ablación de esta proteína en ratones no produce fenotipos comportamentales (Chang, Shao, et al., 2021). Un caso patológico en humanos caracterizado por la ausencia del gen *MAPT* es la microdeleción del cromosoma 17q21.31, lo que genera discapacidad intelectual, epilepsia y pérdida del tono muscular. No obstante, esta deleción incluye a otros genes como *KANSL1*, a partir del cual su pérdida de función es suficiente para generar la misma patología (Zollino et al., 2012). También se ha descripto la participación de tau

en la neurogénesis adulta, determinada por la regulación de su interacción con los microtúbulos (Fuster-Matanzo et al., 2012).

## 2. Fisiopatología de tau

La acumulación anormal de la proteína tau puede ocurrir por diversas causas, y aunque no se conoce particularmente cuál es el mecanismo que inicia el proceso de agregación patológica de esta proteína intrínsecamente desordenada, se ha descripto que puede llegar a formar estructuras altamente organizadas como los ovillos neurofibrilares (NFTs, por sus siglas en inglés), que son característicos de la EA.

### Variantes patogénicas en el gen *MAPT*

Una de las causas que conduce a la patología es la presencia de variantes patogénicas en el gen *MAPT*, de las cuales hasta hoy en día se conocen más de 80 (https://www.alzforum.org/mutations/mapt), tanto en regiones exónicas como intrónicas, las cuales se han asociado a taupatías hereditarias (Figura 6). Estas se encontraron principalmente en la región de unión a microtúbulos y sus proximidades, por lo que afectan el ensamblado de los microtúbulos y favorecen la agregación de tau. Muchas de ellas, además, promueven la fosforilación por quinasas de tau como, por ejemplo, las variantes patogénicas V337M, G272V y P301L (Alonso et al., 2004, 2010). Por otro lado, al ubicarse principalmente en el exón 10 o en las regiones intrónicas que lo flanquean, estas variantes patogénicas también afectan el *splicing* alternativo, por lo que se produce un desbalance de isoformas 3R y 4R de tau en el cerebro adulto que culmina en la formación de agregados proteicos de la isoforma en mayor abundancia (Götz et al., 2019). También algunas variantes patogénicas en el exón 10 afectan los niveles de expresión del ARN mensajero de tau (Arendt et al., 2016).

La mayoría estas variantes patogénicas han sido asociadas a la FTLD-tau con sintomatología de la variante conductual de demencia frontotemporal (bvFTD) en los pacientes (Lane-Donovan y Boxer, 2024). Sin embargo, si bien se conocen algunos casos hereditarios que pueden derivar en fenotipos más similares a PSP o CBD como la variante IVS10+16, en las taupatías primarias predominan los casos esporádicos, en los cuales no hay variantes patogénicas presentes en el gen *MAPT* (Arendt et al., 2016). Los fenotipos que se manifiestan pueden ser muy heterogéneos entre los pacientes, incluso pueden variar entre familiares, por lo que podrían estar determinados por otros factores genéticos y ambientales. Aunque la existencia de numerosas variantes patogénicas en el gen de *MAPT* es considerada la mayor evidencia a favor del rol causal de tau en el proceso neurodegenerativo, los casos esporádicos en las taupatías primarias y la ausencia de variantes patogénicas en taupatías secundarias como la EA,

llevaron a debatir en la comunidad científica si tau era la causa de estas patologías o simplemente un artefacto de un proceso patológico subyacente (Lane-Donovan y Boxer, 2024). Con el tiempo, se ha argumentado a favor de tau como impulsora de la neurodegeneración ya que por ejemplo para la EA, los agregados patológicos de esta proteína obtenidos en imágenes de tomografía de emisión de positrones (PET) y en estudios *post-mortem*, presentan mayor correlación con la aparición de los síntomas clínicos en los pacientes que la presencia de agregados de la proteína β-amiloide.

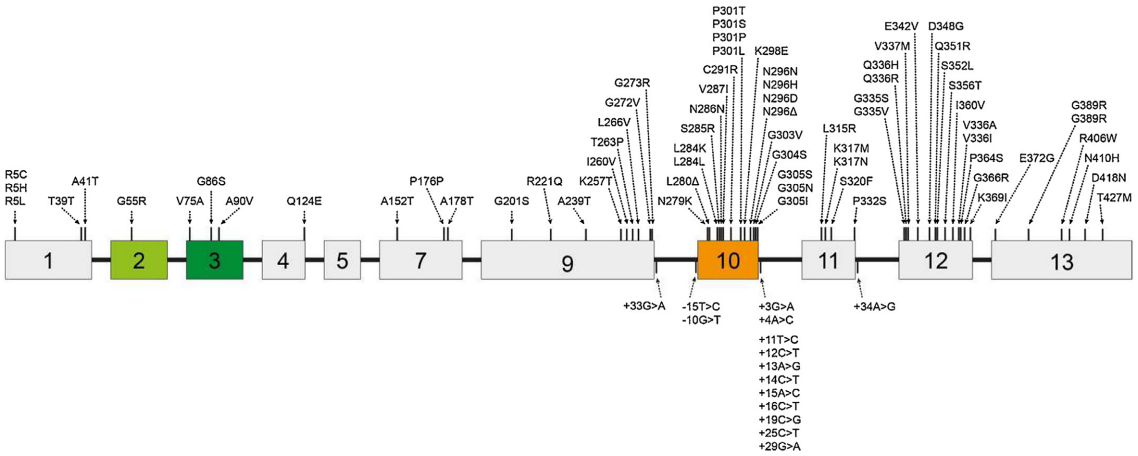



**Figura 6: Variantes patogénicas asociadas a *MAPT*.** Hasta el día de hoy se han descripto más de 80 variantes patogénicas en el gen que codifica para tau, las cuales en su mayoría se encuentran en la región de unión a microtúbulos, lo que favorece la disociación de tau de los axones y su acumulación patológica. Además, la mayoría de estas variantes han sido asociadas a patologías como la bvFTD, dentro de la FTLD-tau. *Adaptado de Arendt et al., 2016.*

## Hiperfosforilación de tau

Como se mencionó anteriormente, la abundancia de residuos susceptibles a fosforilación que presenta tau permite que esta PTM tenga un impacto significativo en su conformación y fisiología (Guo et al., 2017). Bajo condiciones patológicas, tau es hiperfosforilada, por lo que se genera una proteína con mayor carga negativa, reduciendo así su afinidad por los microtúbulos. Probablemente debido a un desbalance en la función de quinasas y fosfatasas de tau, se asume que esta disfunción es crítica para la formación de agregados fibrilares, formando parte de un proceso de múltiples pasos que conducen a la acumulación intracelular de tau (Arendt et al., 2016).

Esto ocurre para fosforilaciones patológicas que se encuentran tanto dentro como fuera del dominio de unión a microtúbulos, aunque no todas ellas implican necesariamente un cambio en la interacción con los microtúbulos (Danis et. al, 2019, pp. 35-46). La fosforilación en la región rica en prolinas, que es la más frecuente, además de interrumpir el ensamblado de los microtúbulos también favorece la agregación de tau. Por otro lado, las fosforilaciones en la región C-terminal de la proteína únicamente inducen su autoagregación (Guo et al., 2017). No se conoce con claridad

cuáles de estos sitios de fosforilación patológica son esenciales para iniciar el proceso degenerativo, así como cuáles son los residuos que se fosforilan como un efecto secundario de la patología. Sin embargo, un estudio ha tratado de identificar cuáles serían los llamados “sitios maestros” a partir de los cuales una vez fosforilados, comenzaría una cascada de fosforilaciones múltiples que llevan a la conformación de tau hiperfosforilada (Stefanoska et al., 2022). Además de favorecer la desestabilización de los microtúbulos y el ensamblado de especies de tau, se ha evidenciado que la hiperfosforilación de esta proteína: induce su deslocalización desde los axones hacia el compartimento somatodendrítico provocando la disfunción sináptica, interrumpe su degradación intracelular como por ejemplo a través de la vía del proteasoma, y altera su interacción con otras proteínas como Fyn o componentes de la membrana plasmática, afectando así mecanismos de señalización, entre otros (Guo et al., 2017).

Aunque la fosforilación patológica es la PTM más frecuente, también hay hiperacetilación de tau que favorece la formación de agregados y bloquea su degradación (Lane-Donovan y Boxer, 2024). Adicionalmente, se ha encontrado en pacientes con EA una excesiva glicosilación. El clivaje de tau también representa una de las modificaciones patológicas más relevantes, ya que tanto los residuos de la región N-terminal como la C-terminal han resultado tóxicos. Los fragmentos de N-terminal que se encuentran fosforilados resultan sinaptotóxicos y son liberados al líquido cefalorraquídeo, por lo que se utilizan como biomarcadores de patología (Shaw et al., 2018; Barthélemy et al., 2020), mientras que los fragmentos de C-terminal pueden formar más agregados proteicos.

**Acumulación patológica de tau**

Bajo estas condiciones patológicas, tau se desacopla de los microtúbulos y comienza un proceso de agregación de pasos consecutivos que termina en la formación de estructuras complejas como los NFTs (Ballatore et al., 2007). A su vez, al liberarse de los microtúbulos, tau es hiperfosforilada y se relocaliza de forma anómala al compartimento somatodendrítico de las neuronas, donde se acumula formando agregados intracelulares patológicos (Zempel y Mandelkow, 2014). En este proceso, la concentración de tau soluble en el citosol aumenta, siendo este un paso crítico para su acumulación, ya que, al estar deslocalizada en el soma, se encuentra más susceptible a fosforilaciones patológicas o plegamientos aberrantes. Tau presenta dos motivos de secuencia que son propensos a formar una estructura de lámina-β, y que son aquellos que favorecen su autoensamblado anormal (Guo et al., 2017). Estos motivos de secuencia son hexapéptidos llamados PHF6 y PHF6* que se ubican en la segunda y tercera región de unión a microtúbulos respectivamente. Debido a que el motivo PHF6*

está codificado por el exón 10, se observa que las isoformas 4R son más propensas a la agregación que las isoformas 3R.

Los agregados patológicos de tau pueden ser diferentes en cada una de las taupatías (Götz et al., 2019), incluso pueden variar entre distintos pacientes con EA (Dujardin et al., 2020). Una de las formas de distinguir estos agregados es a través de su composición de isoformas de tau dependientes del *splicing* alternativo del exón 10 (Goedert y Spillantini, 2019, pp. 3-22). Debido a esto, las taupatías se pueden clasificar en: 1) taupatías 3R+4R: contienen agregados formados por ambas isoformas, como es el caso de los ovillos neurofibrilares (NFTs) en el soma e hilos de neuropilo (NTs) en los procesos neuronales en la EA; 2) taupatías 3R: agregados formados únicamente por isoformas de tau 3R, como es el caso de los cuerpos de Pick y los hilos de neuropilo en las neuronas así como en las ramificaciones de astrocitos en la enfermedad de Pick; 3) taupatías 4R: agregados formados únicamente por isoformas de tau 4R, como es el caso de los ovillos neurofibrilares y ovillos globosos en las neuronas, los astrocitos en penacho y los cuerpos enrollados en los oligodendrocitos de pacientes con PSP (Götz et al., 2019). Como se puede observar, las mismas conformaciones de agregados como los ovillos neurofibrilares pueden estar compuestos de distintas isoformas de tau, así como también se pueden formar otras inclusiones que son características de una enfermedad particular, como los cuerpos de Pick. Por otro lado, también varían los tipos celulares afectados por estos agregados, así como su localización subcelular.

El proceso de agregación patológica de tau comienza con la acumulación de monómeros y dímeros de esta proteína que forman un centro de nucleación o *core* (Figura 7). Una vez que se alcanza un tamaño crítico, sigue la oligomerización de tau de forma dependiente de la concentración y del tiempo (Guo et al., 2017). Estos oligómeros de tau se elongan en filamentos a partir de la acumulación de monómeros de tau que adoptan una conformación paralela, con sus residuos idénticos alineados y formando una estructura de lámina-β cruzada, como ocurre en el caso de los agregados amiloides para la EA. Los filamentos, como los filamentos PHFs (por *paired helical filaments*) y SFs (por *straight filaments*) en la EA, se unen entre sí y son la base para la formación de los agregados finales en la patología como los NFTs. Los filamentos de tau son muy estables, lo que dificulta que la maquinaria celular pueda modificarlos en sus PTMs, conformación y ensamblado. En consecuencia, mecanismos claves en la fisiología celular como la degradación proteica mediante el proteasoma y la autofagia presentan fallas crónicas en las células que presentan estos agregados (Hasegawa, 2019, pp. 23-34).

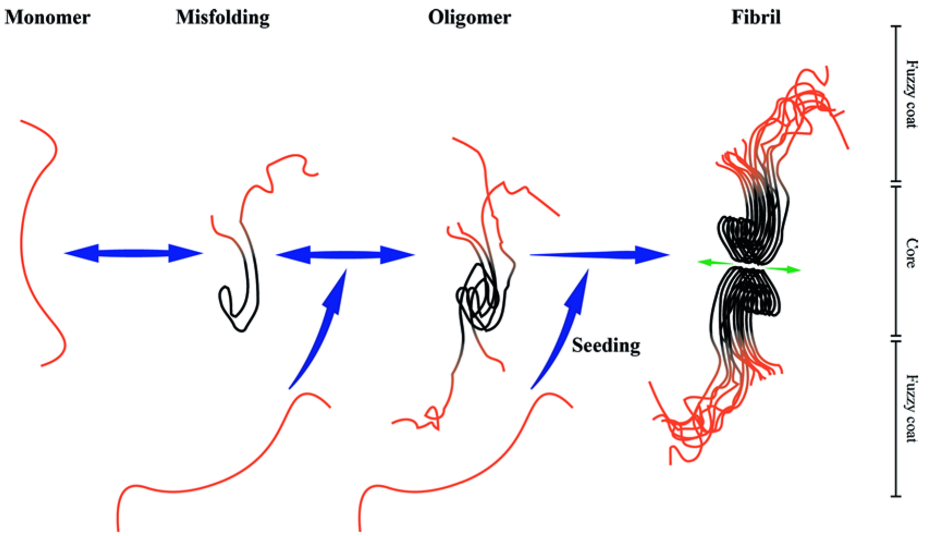



**Figura 7: Proceso de agregación de tau.** Los monómeros de tau naturalmente son solubles, no se encuentran plegados y son flexibles (en naranja). En un contexto patológico, se pueden generar mal plegamientos estables (*misfolding*) que pueden reclutar a otros monómeros de tau, llevándolos a su mal plegamiento y a formar oligómeros. A medida que se acumulan más monómeros de tau, se producen filamentos con una estructura bien definida, que serán aquellas estructuras que se ensamblarán en los agregados finales como los NFTs. Se puede observar en negro el centro de nucleación o *core*, a partir del cual se organizan los monómeros entrantes y se alcanza el tamaño crítico para seguir con la acumulación patológica de tau. *Adaptado de "Tau Prion-Like Propagation: State of the Art and Current Challenges" de Dujardin y Hyman, Tau Biology 2019.*

Los cambios anormales de tau ocurren de forma temprana, y las lesiones de esta proteína gradualmente incrementan en su severidad, presentando un patrón de distribución regional característico (Braak y Del Tredici, 2019, pp. 291-304). Durante muchos años se ha considerado que los agregados insolubles de tau presentan lo que se denomina "una ganancia de función tóxica", siendo estos los que terminan dirigiendo el proceso neurodegenerativo. Sin embargo, se ha descubierto que estos agregados finales como los NFTs permanecen en las neuronas como si fueran "fantasmas", y que son muchas más las neuronas que se mueren o degeneran que aquellas que conservan estas estructuras insolubles (Gómez-Isla et al., 1997). Si bien el número de NFTs en la EA correlaciona con la pérdida neuronal y la severidad de la patología, se ha considerado que debería ser otra la especie patológica de tau que presente aquella "función tóxica". En un modelo murino de expresión inducible de la variante patológica de tau P301L, se ha demostrado que la supresión de su expresión conduce al rescate neuronal y cognitivo, aunque la formación de NFTs continúa en el tiempo (Santacruz et al., 2005). Estos trabajos han llevado a replantear el rol tóxico de los NFTs, redirigiendo la mirada hacia los oligómeros de tau (Lasagna-Reeves et al., 2011). Aunque no se ha determinado todavía la toxicidad de los oligómeros, se propone que estos pueden servir como moldes para las conformaciones mal plegadas de tau y favorecer el proceso de agregación con la consecuente neurodegeneración a través de un mecanismo de propagación desde regiones afectadas hacia otras no afectadas (Gerson y Kayed,

2013). Además, se ha evidenciado la presencia de oligómeros en las sinapsis de pacientes con EA (Colom-Cadena et al., 2023).

### Propagación tipo-priónica y trans-sináptica de tau

El mecanismo de agregación de tau patológica presenta un comportamiento tipo-priónico (Figura 8), que es característico de otras enfermedades neurodegenerativas en las cuales hay acumulación anormal de proteínas, como la proteína β-amiloide y la α-sinucleína (Colin et al., 2019). En las enfermedades priónicas, se produce un cambio conformacional anormal en la proteína asociada a esa patología. Luego esta proteína, ya en su conformación patológica, presenta la capacidad de interactuar con proteínas "normales" o fisiológicas e inducirles el cambio conformacional anormal por contacto. Este mecanismo ocurre en dos pasos: 1) la inducción (o *seeding* en inglés) en la cual se forma la conformación anómala y 2) la propagación (o *spreading*) en la cual hay una expansión de esas conformaciones aberrantes de la proteína (Dujardin y Hyman, 2019, pp. 305-326). Para las taupatías, cuando se forma el centro de nucleación que contiene tau patológica, se propone que este actúa como "semilla" para captar incluso formas fisiológicas de tau y convertirlas en anómalas (Hasegawa, 2019, pp. 23-34). Estas "semillas" de tau patológica pueden propagarse de célula a célula y expandirse a lo largo del cerebro por difusión en el espacio extracelular y a lo largo de los axones (Colin et al., 2019).

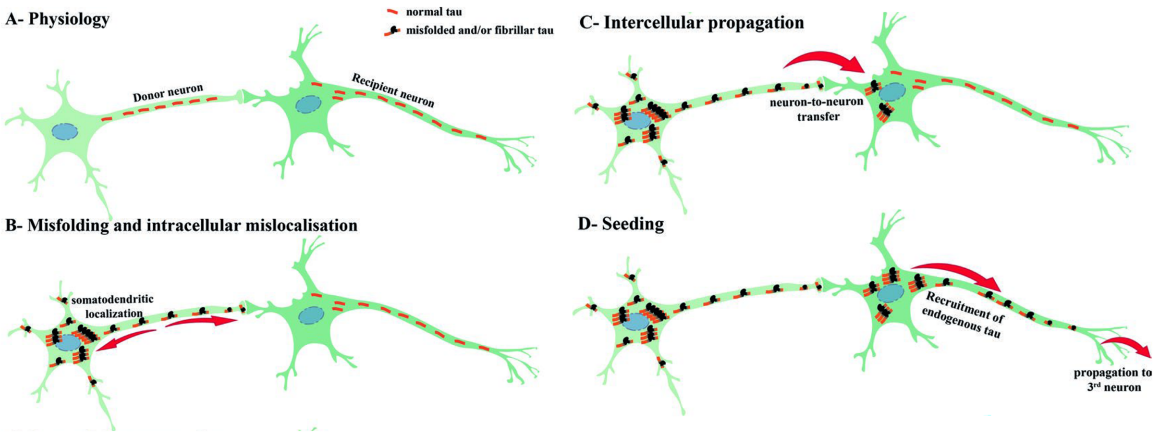



**Figura 8: Mecanismo de propagación tipo-priónica de tau. A.** Fisiológicamente, tau se encuentra principalmente asociada a los axones. **B-D.** En procesos patológicos, tau se desacopla de los microtúbulos, se induce en una conformación mal plegada y se deslocaliza hacia el compartimento somatodendrítico (**B**). A su vez, tau patológica tiene la capacidad de propagarse de neurona a neurona (**C**) y ser captada por una segunda neurona, comenzando un proceso de agregación que implica el reclutamiento de monómeros de tau fisiológica (inducción o *seeding*). Este *seeding* a partir del cual se cambia la conformación de tau fisiológica hacia una conformación patológica (como ocurre con los priones) continúa con la propagación o *spreading* a través de circuitos conectados sinápticamente que permiten la progresión del proceso neurodegenerativo (**D**). *Adaptado de "Tau Prion-Like Propagation: State of the Art and Current Challenges" de Dujardin y Hyman, Tau Biology 2019.*

Esta hipótesis de propagación tipo-priónica de tau tiene como sustento la evidencia de que, en muchas taupatías, la presencia de agregados patológicos avanza en etapas bien definidas, yendo desde áreas inicialmente afectadas hacia otras regiones del cerebro (Colin et al., 2019; Forrest et al., 2019). Por ejemplo, en la EA, la marcación de NFTs y NTs en el cerebro de pacientes se puede definir en 6 estadios progresivos (Figura 9): presencia de estos agregados en la corteza transentorrinal y entorrinal (estadios I-II), en áreas asociativas de la neocorteza (estadios III-IV) y, por último, en todas las áreas primarias y secundarias de la neocorteza (estadios V-VI) (Braak y Braak, 1991). Esto se ha determinado también para otras taupatías como la PSP y la enfermedad de Pick (Figura 9) (Colin et al., 2019). Las taupatías en las cuales se reconocen etapas definidas en la formación de agregados de tau, sugieren que la propagación de tau patológica ocurre a través de regiones sinápticamente conectadas entre sí. Asimismo, este mecanismo ha sido evidenciado mediante la detección de ligandos de tau patológica por PET en pacientes con EA y con taupatías primarias (Franzmeier et al., 2020, 2022).

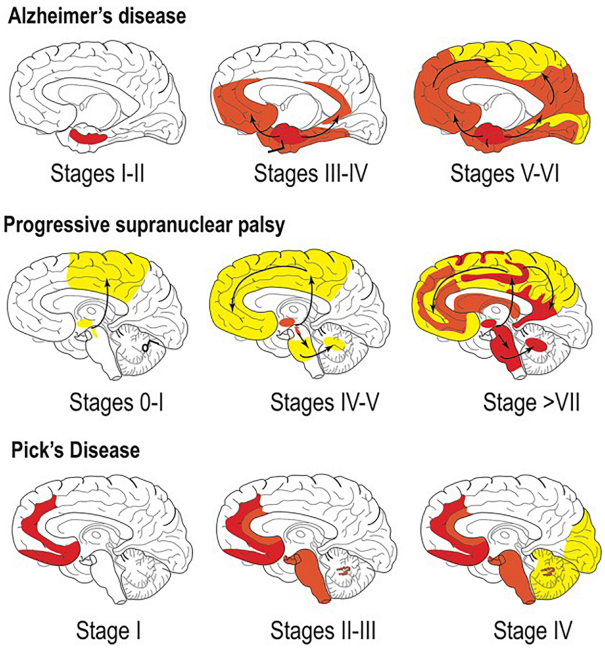



**Figura 9: Distribución topográfica de la acumulación de tau en distintas taupatías.** Estadios de Braak determinados por la marcación de tau patológica en cerebros de pacientes *post-mortem*. Para ciertas taupatías como la enfermedad de Alzheimer (arriba), la parálisis supranuclear progresiva (medio) y la enfermedad de Pick (abajo), las áreas afectadas se encuentran bien definidas y suelen seguir un patrón neurodegenerativo característico que deriva en las sintomatologías presentes en los pacientes. Generalmente, este patrón se determina a partir de regiones conectadas sinápticamente entre sí. *Adaptado de Colin et al., 2019.*

Sumado a esto, otra evidencia a favor de la propagación tipo-priónica de tau a través de su difusión en el espacio extracelular, es mediante la detección de esta

proteína en el líquido cefalorraquídeo (CSF en inglés) de pacientes con EA, la cual aumenta en su concentración conforme avanza la patología (Barthélemy et al., 2016). Esta medición es indirecta ya que se asume que la proteína que se libera al líquido intersticial (el cual se encuentra entre las células del cerebro), también llega en menor proporción al CSF. Como resulta imposible tomar muestras de líquido intersticial, se realiza una toma de CSF en los pacientes para detectar biomarcadores de tau que comúnmente se utilizan en la clínica, particularmente tau total y p-tau181 (Shaw et al., 2018; Barthélemy et al., 2020; Mummery et al., 2023). Para poder determinar la relación lineal entre la concentración de tau en el líquido intersticial y en el CSF, se han evaluado modelos murinos transgénicos donde efectivamente se comprobó que los niveles de tau patológica fueron detectados en ambas regiones (Yamada et al., 2011; Takeda et al., 2015).

La propagación trans-sináptica de tau *in vivo* es biológicamente posible y se ha demostrado a través de modelos que producen tau patológica de forma localizada en el cerebro (Harris et al., 2012; Liu et al., 2012; Wegmann et al., 2019) o a través de la inyección localizada de agregados insolubles de tau (Clavaguera et al., 2009; Iba et al., 2013; Ahmed et al., 2014). Sin embargo, esta propagación podría ser inducida por la alta concentración de tau patológica, ya que este mecanismo es dependiente de la dosis, como se mencionó anteriormente. Además, en algunos de estos trabajos se ha demostrado que las neuronas o regiones del cerebro que han captado esta proteína anómala no presentan algún fenotipo asociado a la neurodegeneración (Harris et al., 2012; Iba et al., 2013; Wegmann et al., 2019). Por otro lado, se ha detectado la marcación de oligómeros de tau (además de formas mal plegadas e hiperfosforiladas) en el compartimento pre y postsináptico de pacientes con EA, incluso en ausencia de agregados insolubles como los NFTs (Colom-Cadena et al., 2023). Los autores sugirieron que estos oligómeros se acumulan en las sinapsis de forma temprana y luego se propagan trans-sinápticamente a lo largo del cerebro. Adicionalmente, se ha demostrado que tau puede propagarse a través del espacio extracelular de forma dependiente de la actividad eléctrica (Wu et al., 2016).

**Rol de tau patológica asociada a la actividad eléctrica y al segmento inicial del axón**

El estudio de la deslocalización al compartimento somatodendrítico y la propagación trans-sináptica de tau patológica ha demostrado su rol potencial en la disfunción sináptica y por lo tanto en la actividad eléctrica. En la EA, la pérdida de las sinapsis, así como la alteración en marcadores sinápticos, son las dos variables que mayormente correlacionan con el deterioro cognitivo (Dekosky y Scheff, 1990; Terry et

al., 1991; De Wilde et al., 2016). En modelos experimentales, se ha demostrado que la inyección de oligómeros de tau en ratones *wild-type* (WT) produce efectos tóxicos en las sinapsis, además de la disfunción en mitocondrias y la neurodegeneración (Lasagna-Reeves et al., 2011). Asimismo, se ha observado la alteración en las funciones o el contenido de proteínas de la sinapsis en modelos murinos que expresan la variante patogénica P301L de forma global o sitio-específica (Hoover et al., 2010; Harris et al., 2012; Kopeikina et al., 2013).

Como la acumulación de especies tóxicas de tau ocurre tanto en el compartimento presináptico como en el postsináptico de pacientes con EA (Tai et al., 2012, 2014; Colom-Cadena et al., 2023), los mecanismos mediante los cuales se puede alterar la función sináptica son diferentes entre estos dos compartimentos. En el compartimento presináptico, se ha observado que tau patológica interactúa con las vesículas sinápticas, reduciendo su movilidad y por lo tanto afectando la liberación de neurotransmisores en condiciones de excitabilidad neuronal (Zhou et al., 2017). Esta interacción estaría mediada por sinaptogirina 3, ya que el silenciamiento de esta proteína redujo los déficits presinápticos presentes en modelos de taupatía (McInnes et al., 2018). Por otro lado, la deslocalización de tau patológica y su acumulación en el compartimento somatodendrítico fueron estudiadas por sus efectos en la densidad postsináptica, ya que ambos mecanismos afectan de forma indirecta a los receptores de glutamato como NMDA y AMPA. Se ha demostrado que distintas PTMs patológicas de tau pueden disminuir el anclaje en la densidad postsináptica o el tráfico de los receptores de glutamato en las dendritas, generando así disfunción sináptica (Hoover et al., 2010; Zhao et al., 2016; A. Ittner e Ittner, 2018).

Debido a esto, existe una relación entre tau y la actividad eléctrica que ha ido ganando mayor relevancia con el tiempo. Por un lado, en modelos murinos de taupatía, se ha observado que tau patológica *per se* presenta una ganancia de función tóxica que genera un aumento en la excitabilidad de redes neuronales (García-Cabrero et al., 2013; Wheeler et al., 2015; Maeda et al., 2016) y en la potencia de oscilaciones cerebrales (Das et al., 2018). Adicionalmente, se han realizado muchos estudios con el fin de comprender el rol de tau en su contribución o facilitación de ciertos mecanismos implicados en distintas enfermedades neurológicas. Uno de los casos más relevantes es en el contexto de la EA, en la cual algunos pacientes presentan actividad epiléptica asociada a la acumulación patológica de la proteína β-amiloide (Vossel et al., 2017), la cual también ha sido modelada experimentalmente *in vivo* (Lalonde et al., 2005; Minkeviciene et al., 2009; Busche et al., 2012). En el modelo animal APP23, que presenta la variante patogénica sueca en el gen que codifica para la proteína β-amiloide,

la cruza con ratones mutantes nulos para tau (*Mapt*$^{-/-}$) disminuyó de forma significativa la susceptibilidad a ataques epilépticos producidos por la acumulación anormal de Aβ (Ittner et al., 2010). Esto se debe a que, en ausencia de tau, el reclutamiento de la quinasa Fyn a la densidad postsináptica es menor, reduciendo así la excitotoxicidad inducida por el receptor de NMDA.

Este trabajo, junto al de Roberson et al., 2007, han sido pioneros en demostrar que, si bien la proteína tau no parecería ser la efectora o mediadora en el mecanismo de excitotoxicidad, presenta un papel clave en facilitar dicho proceso (Chang, Shao, et al., 2021). A partir de esto, se han realizado nuevos trabajos demostrando que en el marco de enfermedades neurológicas las cuales no necesariamente aparenten o impliquen la acumulación patológica de tau, la presencia de esta proteína en su conformación fisiológica generaría mayor predisposición a una actividad eléctrica anormal en el cerebro. Esto fue demostrado por la cruza de modelos de epilepsia, de accidente cerebrovascular y de autismo con ratones *Mapt*$^{-/-}$ a partir de los cuales se observó en su descendencia una mejoría en determinados fenotipos de comportamiento y de desbalance de redes neuronales (Holth et al., 2013; Gheyara et al., 2014; Bi et al., 2017; Tai et al., 2020). Con estos resultados, se han descubierto diversos mecanismos que implican una excitotoxicidad mediada por tau y el receptor de NMDA en la densidad postsináptica (A. Ittner e Ittner, 2018). También, se ha comprobado que el silenciamiento de tau mediante el uso de oligonucléotidos antisentido (ASOs, por sus siglas en inglés) protege a ratones WT frente a ataques epilépticos inducidos (DeVos et al., 2013). Esto ha demostrado, que los efectos protectores por la disminución en los niveles de tau en el cerebro adulto no se deben a mecanismos de compensación que pueden ocurrir en el modelo *Mapt*$^{-/-}$. En este escenario, se ha observado además que el aumento en la actividad eléctrica favorecería la propagación y acumulación patológica de tau *in vivo* (Wu et al., 2016), presentando un modelo relevante para entender el mecanismo sinérgico entre tau y Aβ mediado por la excitotoxicidad en la EA. Asimismo, se ha detectado acumulación de tau hiperfosforilada en cerebros *post-mortem* de pacientes con epilepsia refractaria (Thom et al., 2011).

La mayor predisposición a mecanismos de epileptogénesis en presencia de tau parecería ser producida a partir de la modulación diferencial de neuronas excitatorias e inhibitorias, generando así desbalances en las redes neuronales (Chang, Evans, et al., 2021). En registros de *patch-clamp* en la corteza de ratones *Mapt*$^{-/-}$ se ha detectado una disminución en la actividad espontánea de neuronas excitatorias, mientras que la excitabilidad de las neuronas inhibitorias o interneuronas se encontraba aumentada. El efecto diferencial en la actividad eléctrica entre estos subtipos neuronales redujo la

hipersincronía de redes, la cual es de suma importancia en el contexto de la actividad epiléptica. Por lo tanto, tau parecería afectar de forma diferencial a distintos subtipos neuronales de forma directa participando en mecanismos específicos para cada subtipo celular o bien afectando un subtipo celular particular y teniendo efectos indirectos sobre el otro, generando entonces cambios homeostáticos en las sinapsis o en la modulación de la actividad eléctrica.

Uno de los mecanismos moleculares descriptos mediante los cuales tau puede regular la excitabilidad neuronal es a través de su interacción con el segmento inicial del axón (AIS, por sus siglas en inglés). El AIS, es una región especializada ubicada cerca del inicio del axón, a partir de la cual se inicia el potencial de acción (Grubb y Burrone, 2010). Se conforma por estructuras filamentosas de redes de citoesqueleto por debajo de la membrana (Jones et al., 2014; Leterrier et al., 2015), que se componen de diversas proteínas en las cuales la más destacada es la anquirina G. Estas proteínas actúan como andamio para los canales iónicos dependientes de voltaje en la membrana, que son aquellos que llevan a cabo el potencial de acción. Se ha descripto que el AIS puede presentar modificaciones reversibles en sus componentes, ya sea del citoesqueleto o en los canales iónicos, en respuesta a la actividad eléctrica (Grubb y Burrone, 2010). En este contexto, se ha propuesto que la plasticidad de esta estructura constituye un mecanismo adaptativo clave en la regulación de la excitabilidad neuronal. Cambios prolongados en la actividad eléctrica pueden generar cambios en la posición y la longitud del AIS (Grubb et al., 2011). En general, lo que se ha descripto es que una actividad eléctrica exacerbada incrementa la distancia entre el AIS y el soma en un proceso reversible (Grubb y Burrone, 2010), mientras que la falta de *inputs* eléctricos aumenta la longitud del AIS (Kuba et al., 2010). Sin embargo, la composición del AIS, así como la modulación en su posición y longitud parecerían depender del subtipo neuronal, ya que se han encontrado distintas respuestas adaptativas a la estimulación eléctrica prolongada (Grubb et al., 2011).

Se ha demostrado que en el AIS existe una barrera de difusión de tau que controla el tráfico anterógrado y retrógrado de esta proteína, reteniéndola mayoritariamente en los axones (Li et al., 2011). Por otro lado, la exposición de neuronas a los agregados de Aβ (Zempel et al., 2017) o la acetilación patológica de tau (Sohn et al., 2016) producen cambios en la estabilidad del AIS que favorecen la deslocalización de tau hacia el compartimento somatodendrítico. Asimismo, la hiperfosforilación de tau genera cambios en la localización del AIS (Hatch et al., 2017). En un modelo asociado a FTD de neuronas humanas diferenciadas, se pudo observar que la variante patológica V337M acorta la longitud del AIS, altera su plasticidad en respuesta a aumentos en la

actividad eléctrica y por lo tanto produce una hipersincronía de redes neuronales (Sohn et al., 2019). Esto se debe a que esta forma patológica de tau presenta mayor afinidad por EB3, una proteína asociada al AIS, favoreciendo su reclutamiento e interacción con la proteína estructural anquirina G. Como consecuencia, el AIS presenta mayor rigidez y pierde su plasticidad. Por último, se ha observado que el efecto diferencial de tau sobre la modulación en la actividad eléctrica de neuronas excitatorias e inhibitorias podría explicarse por cambios específicos en la localización y la longitud del AIS según el subtipo neuronal (Chang, Evans, et al., 2021).

**Mecanismos de vulnerabilidad selectiva en taupatías**

La propagación tipo-priónica de tau junto con la evidencia a partir de las tinciones *post-mortem* y registros de PET demostrando que la progresión en la formación de agregados de tau en áreas sinápticamente conectadas presenta un patrón particular dependiendo del tipo de patología, sugieren la existencia de mecanismos de vulnerabilidad selectiva regional en las taupatías (Fu et al., 2018; Forrest et al., 2019). También se ha identificado que ciertos tipos neuronales presentan mayor predisposición a la acumulación anormal de tau, mientras que otras células vecinas parecerían afectarse en menor medida o no afectarse por la patología. Este mecanismo es conocido como vulnerabilidad selectiva neuronal. Esto significa que, según la taupatía, habrá regiones y tipos neuronales primariamente afectados por tau patológica que serán aquellos que determinen las primeras sintomatologías en los pacientes que padecen la enfermedad (vulnerabilidad selectiva primaria). Luego, a medida que tau se propaga trans-sinápticamente, con el tiempo se afectarán otras regiones y tipos neuronales hasta expandirse a lo largo del cerebro (vulnerabilidad selectiva secundaria). Esto ocurre para otras proteinopatías neurodegenerativas, que se caracterizan por la acumulación anormal de proteínas en el cerebro, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, entre otras (Fu et al., 2018).

Para el caso de la vulnerabilidad selectiva regional en las taupatías primarias, por ejemplo, estas se pueden dividir en dos grandes grupos según las sintomatologías clínicas que se manifiesten (Forrest et al., 2019): 1) aquellas con afecciones cognitivas como la variante conductual de la demencia frontotemporal (bvFTD) o la afasia progresiva primaria (PPA), se caracterizan por la acumulación anormal de tau más severa en la corteza y en regiones límbicas; y 2) aquellas con afecciones motoras, también llamadas parkinsonismos atípicos, donde se afectan mayoritariamente los ganglios basales y el tronco encefálico, como la PSP o la CBD. Si bien el concepto de propagación trans-sináptica incluye la participación de redes neuronales características para cada patología, muchas de las taupatías primarias incluyen la acumulación anormal

de tau en células de la glía (Götz et al., 2019). Además, según la patología, se pueden desarrollar distintos agregados de tau, que afectarán de forma diferencial a determinadas regiones, subtipos neuronales y no neuronales (Fu et al., 2018; Götz et al., 2019). Particularmente para las taupatías primarias (Figura 10), si bien las patologías se pueden caracterizar según los agregados patológicos de tau que se formen, lo que resulta clínicamente relevante es conocer las regiones que se encuentran afectadas, independientemente de la especie tóxica de tau que presenten los pacientes (Lane-Donovan y Boxer, 2024). Algunas taupatías como por ejemplo la PSP y la enfermedad de Pick se caracterizan por un patrón del curso de la patología bien definido, mientras que otras enfermedades como la CBD pueden variar ampliamente en su fenotipo clínico. Sumado a esto, para la FTLD, se ha evidenciado que existe la acumulación anormal de otras proteínas diferentes a tau como TDP-43 o FUS, que convergen en afectar ciertas regiones y tipos neuronales similares a la FTLD-tau, por lo que derivan en signos clínicos similares, aunque presenten distintos agregados patológicos (Forrest et al., 2019).

En la vulnerabilidad selectiva neuronal, se han descripto los tipos neuronales vulnerables a la acumulación de tau, los cuales dependen de la patología y la región afectada. En el caso de la EA, las primeras células que se degeneran son las neuronas piramidales de la capa II de la corteza entorrinal (CE), del subículo y de la región CA1 del hipocampo, las neuronas colinérgicas corticopetales en el prosencéfalo y las neuronas noradrenérgicas del locus cerúleo (Fu et al., 2018). Además, se han podido identificar algunos marcadores que son característicos de neuronas vulnerables como, por ejemplo, relina para las neuronas de la capa II de la CE y SMI32 para las neuronas piramidales. Por otro lado, las neuronas granulares del giro dentado, las partes más profundas de la capa III y las capas V y VI de la corteza entorrinal, así como las interneuronas corticales se encuentran relativamente preservadas en etapas tempranas en la EA (Fu et al., 2018). En la FTLD, particularmente para la bvFTLD, se ha demostrado que se degeneran las neuronas de von Economo (VENs) de la capa Vb de la corteza cingulada anterior y la ínsula frontal, aunque no se demostrado todavía la formación de agregados patológicos de tau o TPD-43 en estas (Fu et al., 2018). Comprender por qué en una patología tan diversa como la FTLD, distintos mecanismos moleculares y proteínas llevan a la degeneración de ciertos tipos neuronales y no neuronales, afectando las mismas regiones del cerebro y derivando así en una misma sintomatología, mientras que otras regiones se encuentran menos afectadas, todavía sigue siendo un área de estudio en desarrollo (Forrest et al., 2019).

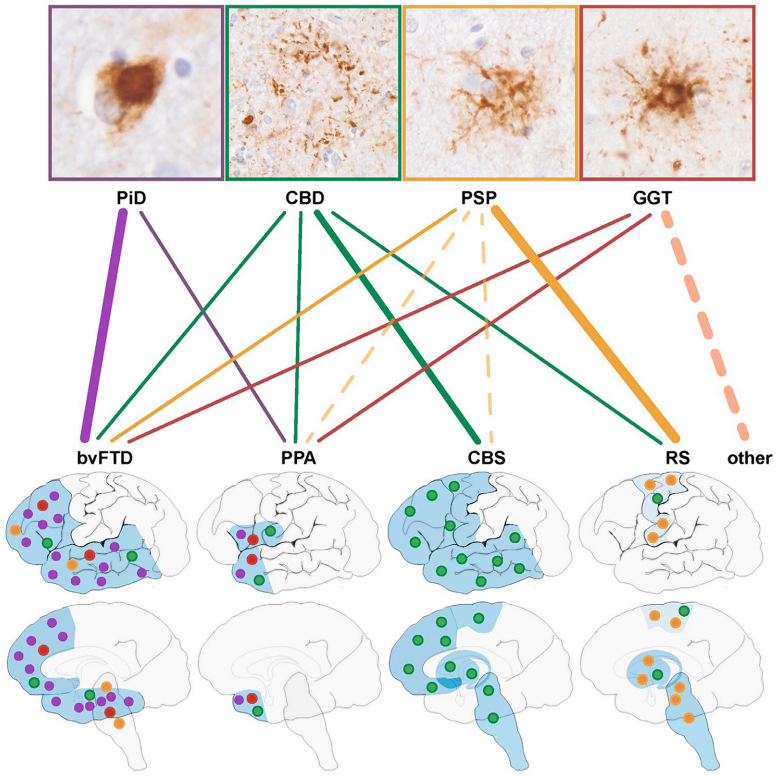



**Figura 10: Distribución regional de agregados de tau patológica y sintomatologías en las taupatías primarias.** Diagrama mostrando las patologías más relevantes dentro de las taupatías primarias, con sus agregados patológicos de tau característicos, y su asociación con las posibles sintomatologías que estas enfermedades pueden adquirir según la región afectada. De acuerdo con el grosor de las líneas de asociación, será la proporción de casos reportados que adquieren ciertos signos clínicos. Para taupatías bien definidas como la enfermedad de Pick (PiD) y la parálisis supranuclear progresiva (PSP), mayoritariamente las sintomatologías se definen por la variante conductual de la demencia frontotemporal (bvFTD) y el síndrome de Richardson (RS), respectivamente. En cambio, en la degeneración corticobasal (CBD), si bien la mayoría de los signos clínicos se pueden asociar con el síndrome corticobasal (CBS), también puede derivar en bvFTD, RS y afasia primaria progresiva (PPA). Para la taupatía globular glial (GGT), los síntomas son aún más heterogéneos que en la CBD y en algunos casos se asocian con otras enfermedades. *Adaptado de Forrest et al., 2019.*

El análisis de estudios de asociación de genoma completo (GWAS, en inglés), que permite identificar ciertos factores de riesgo en pacientes, junto con la determinación de los perfiles de expresión de tejido y de subtipos celulares que permiten distinguir aquellas poblaciones celulares que se encuentran afectadas de las que no, serán claves en determinar los mecanismos moleculares que subyacen a la vulnerabilidad selectiva en las taupatías. Por ejemplo, se ha detectado que las neuronas excitatorias en regiones afectadas por la EA son más vulnerables a la presencia de tau patológica que las inhibitorias por la expresión diferencial de un gen facilitador de la autofagia, *BAG3*, que parecería ser clave en la homeostasis de tau (Fu et al., 2019). También se ha identificado dentro de las poblaciones de la CE en pacientes con EA, un marcador particular de neuronas excitatorias vulnerables a tau patológica, *RORB*, que es un factor clave en la

determinación de la identidad de los subtipos neuronales de la neocorteza en el desarrollo (Leng et al., 2021).

## 3. Modelos murinos de taupatía

Uno de los aspectos que fueron necesarios para poder modelar *in vivo* a las taupatías, proceso que fue realizado mayoritariamente en ratones, se centró en poder recapitular los procesos bioquímicos e histológicos que ocurren en estas patologías. Si bien esto ha sido realizado mediante diversas estrategias, se logró principalmente a través de la sobreexpresión de variantes de tau patológica humana como la P301L y la P301S, principalmente asociadas a la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17 (FTDP-17) (Götz y Götz, 2019, pp. 381-392). Un desafío importante para modelar las taupatías, es la reproducción de ciertos fenotipos cognitivos y motores, que sean correlato de aquellas sintomatologías presentes en los pacientes. Como se vio anteriormente, la acumulación patológica de tau en determinadas áreas del cerebro correlaciona con los signos clínicos que se desarrollan, por lo que este mecanismo en los modelos murinos de taupatía dependerá de los patrones de expresión en el cerebro y el número de copias del transgén que estos presenten (Götz y Götz 2019, pp. 381-392). Además, la mayoría de los modelos distan de recapitular las patologías que se caracterizan por la propagación de tau en un patrón específico a lo largo del cerebro. Sin embargo, para la EA, esto ha sido logrado en algunos casos en ratones transgénicos (Harris et al., 2012; Liu et al., 2012) o a través de inyecciones localizadas de vectores virales (Dujardin et al., 2018; Wegmann et al., 2019).

### El modelo htau

Solo algunos pocos modelos murinos presentan el gen *MAPT* humano completo, tanto con su propio promotor, regiones regulatorias y todos sus exones e intrones (Duff et al., 2000; Andorfer et al., 2003; Dawson et al., 2007). El ratón htau es un modelo murino de taupatía ampliamente validado (Andorfer et al., 2003, 2005; Polydoro et al., 2009; Espíndola et al., 2018; Damianich et al., 2021), que expresa el gen humano *MAPT* normal y completo a partir de un cromosoma artificial (PAC) con haplotipo humano H1, que tal como se mencionó anteriormente, su presencia en homocigosis predispone a taupatías. Este transgén fue introducido por microinyección pronuclear en bajo número de copias en ratones WT, generando el modelo 8c que ha demostrado niveles de producción de tau humana y murina 3,5 veces mayores a ratones no transgénicos (Duff et al., 2000). Luego, el modelo htau fue obtenido a partir de la cruza de ratones 8c con mutantes nulos para tau murina (Tucker et al., 2001), hasta lograr un fondo genético *Mapt*$^{-/-}$ con la expresión del PAC que contiene al gen *MAPT* humano. Debido a esto, el

ratón htau no expresa formas mutantes de tau y produce únicamente las seis isoformas de la proteína humana. Sin embargo, se ha observado en este modelo que, si bien no presenta variantes patogénicas, se produce un exceso de la isoforma 3R en comparación con la 4R (Andorfer et al., 2003; Espíndola et al., 2018). Este desbalance de isoformas se podría producir por una falta de elementos en *trans* en el ratón, que serían necesarios para el correcto *splicing* alternativo del exón 10.

En el ratón htau, se ha determinado que el exceso en la producción de la isoforma 3R es suficiente para producir: presencia de tau insoluble desde los 2 meses de edad, redistribución de tau a cuerpos celulares y a las dendritas desde los 3 meses y acumulación de tau hiperfosforilada desde los 6 meses. Todos estos fenotipos fueron más prominentes en el hipocampo y en la neocorteza, aumentando en su severidad con el envejecimiento (Andorfer et al., 2003; Polydoro et al., 2009). También se ha observado fragmentación de ADN y muerte neuronal (Andorfer et al., 2005). La acumulación patológica de tau genera en este modelo disfunción sináptica y fallas en el aprendizaje y la memoria en ratones envejecidos (Polydoro et al., 2009).

## 4. Estrategias terapéuticas para las taupatías

Si bien el gen *MAPT* codifica una proteína con efectos pleiotrópicos dentro de diversas enfermedades neurodegenerativas, esto no siempre se ha considerado así. En la EA, se ha determinado por mucho tiempo que, por la hipótesis de la cascada amiloide, la proteína β-amiloide tenía un rol protagónico, mientras que tau presentaba un papel secundario (Buee, 2019, pp. 407-416). Luego de varios años de tratamientos anti-Aβ que no demostraron mejorías sustanciales en ensayos clínicos para fases avanzadas de la EA, se fue incrementando la variedad y el número de enfoques que presentan a tau como blanco terapéutico. Hoy en día existen más de 20 estrategias terapéuticas dirigidas contra tau en ensayos clínicos, desde pequeñas moléculas inhibidoras de la acetilación, agregación, O-GlcNAcilación o fosforilación, así como inmunoterapias activas y pasivas (Figura 11) (Chang, Shao, et al., 2021; Lane-Donovan y Boxer, 2024). La mayoría de estos ensayos tienen como blanco distintas formas patológicas de tau, que pueden variar en sus PTMs o estados de agregación. También se pueden encontrar terapias contra proteínas que interaccionan con tau, principalmente para las quinasas GSK-3β y Fyn. Aunque estas puedan resultar estrategias promisorias, en las taupatías la contribución de distintas formas patológicas de tau puede variar, además de presentar gran diversidad en su sintomatología clínica, ya que esto depende de las regiones que se encuentren afectadas, como se mencionó anteriormente para las taupatías primarias (Forrest et al., 2019). También es importante determinar cuáles de estos agregados de

tau son aquellos que presentan toxicidad y capacidad de propagación tipo-priónica, además de considerar si estos actúan de forma intra o extracelular. Asimismo, otra pregunta que resulta relevante para determinar en el futuro es cuáles son los mecanismos río abajo de tau que son claves para el avance del proceso neurodegenerativo. El amplio espectro de posibles manifestaciones clínicas, formas patológicas de tau y mecanismos que conducen a la neurodegeneración representa un gran desafío para el desarrollo terapéutico contra las taupatías.

Debido a esto, aquellas estrategias que logran reducir los niveles globales de tau parecen ser las más prometedoras, ya que podrían evitar la acumulación patológica de esta proteína sin la necesidad de establecer precisamente cuáles son las formas patológicas y mecanismos determinantes para cada taupatía. El enfoque terapéutico más utilizado es el uso de inmunoterapias pasivas contra tau. Primariamente, estas se han focalizado en producir anticuerpos que se incorporan dentro de las células, logrando reducir distintos agregados patológicos y con cierto rescate de fenotipos cognitivos en modelos preclínicos (Colin et al., 2019). Sin embargo, con la hipótesis de la propagación tipo-priónica de tau y la validación de la secreción y recaptación de tau patológica en diferentes modelos (Dujardin y Hyman, 2019, pp. 305-326), la estrategia terapéutica en las inmunoterapias se dirigió contra tau extracelular, con el fin de evitar o disminuir la progresión del proceso neurodegenerativo (Colin et al., 2019). La mayoría de las terapias que se encuentran en ensayos clínicos utilizan este último enfoque, presentando distintos blancos de la proteína como el dominio rico en prolinas, la región de unión a microtúbulos y el dominio C-terminal, además de dirigirse a tau oligomérica (Lane-Donovan y Boxer, 2024). Con el curso de los ensayos clínicos de inmunoterapias será relevante evaluar si el bloqueo de tau extracelular es suficiente para reducir los efectos de tau patológica intracelular y frenar el proceso neurodegenerativo.

Como se sugiere en Chang, Shao et al. (2021), si los procesos primarios que conducen a las taupatías ocurren dentro de las neuronas, como por ejemplo la disfunción en dendritas o terminales presinápticos, así como el proceso de agregación que permite el *seeding* y *spreading*, dirigirse terapéuticamente a la acumulación y propagación patológica de tau no tendría resultados positivos en ensayos clínicos. En este contexto, la estrategia basada en el silenciamiento génico de tau surge como una terapia alternativa, respaldada por los beneficios de la ablación genética o parcial de la expresión de *MAPT* en modelos preclínicos (Roberson et al., 2007; Ittner et al., 2010; DeVos et al., 2017). Dentro de este enfoque, el uso de ASOs representa actualmente la herramienta más avanzada en términos de desarrollo y aplicación (Figura 11).

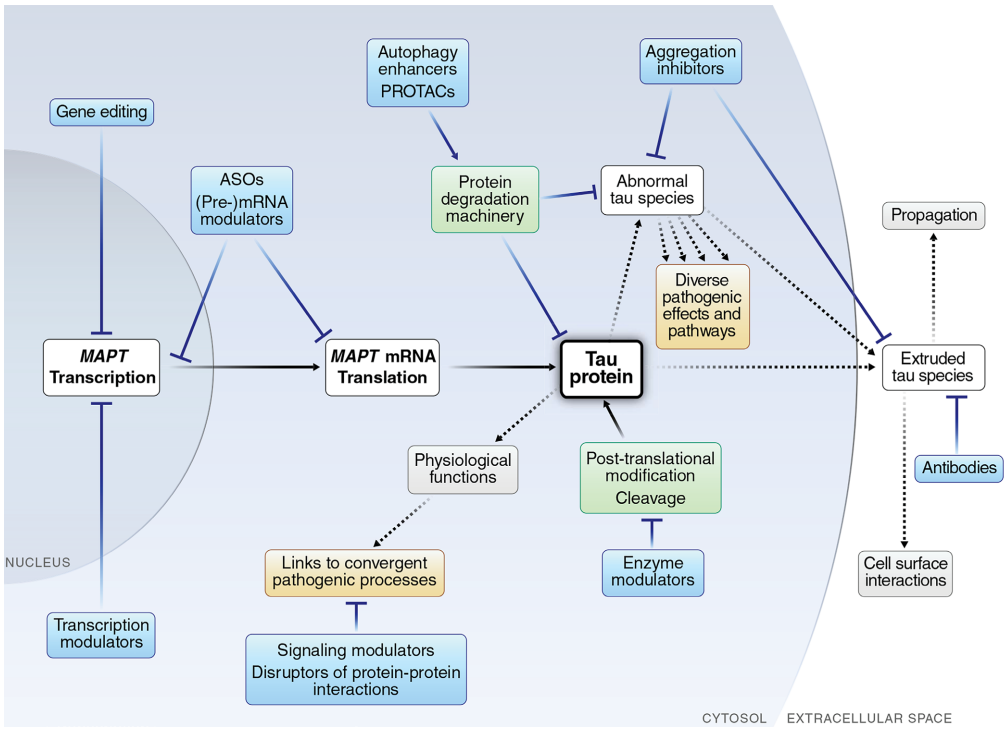



**Figura 11: Estrategias terapéuticas contra tau.** Si bien hoy en día la mayoría de las terapias apuntan contra la proteína y sus variantes patológicas, existen enfoques que tienen como blanco terapéutico elementos río arriba de la formación de tau, como por ejemplo el ARN mensajero de *MAPT*. En este último caso, la estrategia de ASOs es la más avanzada y utilizada como mecanismo de silenciamiento génico en diversas enfermedades neurodegenerativas. *Adaptado de Chang, Shao, et al., 2021.*

## El ARN mensajero de *MAPT* como blanco terapéutico: ventajas y desventajas

Como se mencionó anteriormente, los primeros trabajos en demostrar que la cruza de animales *Mapt*$^{-/-}$ con modelos de Aβ presentaba beneficios frente a la excitotoxicidad (Roberson et al., 2007; Ittner et al., 2010), permitieron explorar los beneficios de la ausencia de tau en otros modelos de patologías neurológicas (Holth et al., 2013; Gheyara et al., 2014; Bi et al., 2017; C. Tai et al., 2020). Resultados similares se observaron en el silenciamiento de tau mediado por ASOs, que demostraron que la disminución de los niveles del ARN mensajero de *MAPT* fue protectora frente a ataques epilépticos inducidos en ratones WT (DeVos et al., 2013) y permitió revertir la acumulación de tau patológica y la neurodegeneración en el hipocampo de un modelo murino de taupatía (DeVos et al., 2017). Además, todos estos trabajos sugieren que la ablación genética de tau demostró ser bien tolerada en ratones, así como el silenciamiento mediado por ASOs, incluso en primates no humanos (DeVos et al., 2017).

La estrategia de ASOs ha surgido como la más relevante de las terapias dirigidas al ARN para tratar distintas enfermedades (Bennett, 2019). El uso del ARN como blanco terapéutico en ciertas patologías surge de la necesidad de ampliar el rango de posibles tratamientos frente a los cuales el diseño de pequeñas moléculas o fármacos que se dirigen a determinadas formas proteicas conlleva grandes esfuerzos para lograr su

interacción y final efecto biológico. Mediante la modulación del ARN mensajero primario o maduro, junto a la creciente información sobre la regulación mediada por distintos ARNs no codificantes en la naturaleza, se pueden modificar los niveles de producción de la proteína de interés de una forma más rápida y sencilla que mediante las estrategias terapéuticas convencionales. Para el caso particular de los ASOs, estos se definen como oligonucleótidos sintetizados químicamente de 12-30 nucleótidos de longitud en general, que pueden variar en su naturaleza y mecanismos de acción. Principalmente son utilizados para el silenciamiento de proteínas, utilizando mecanismos ARN de interferencia (ARNi) propios de la célula, aunque también pueden generar cambios en el *splicing* alternativo. Para las enfermedades neurodegenerativas, el ASO Nusinersen (Spinraza) ha demostrado el mayor éxito en ensayos clínicos para el tratamiento de la atrofia muscular espinal (Mercuri et al., 2018). Con respecto a tau, se ha desarrollado una terapia basada en ASOs que permite reducir los niveles de esta proteína, a partir del estudio en el modelo de taupatía PS19 (DeVos et al., 2017), que actualmente se encuentra en fase II de ensayos clínicos para el tratamiento de la EA (BIIB080 en ClinicalTrails.gov). Hasta el momento, la administración de los ASOs de manera global en ensayos clínicos mostró una reducción de alrededor del 50% del marcador de tau patológica p-tau181 en el CSF de pacientes tratados sin efectos adversos graves, así como una disminución parcial del marcador de tau-PET MK6240 (Mummery et al., 2023; Lane-Donovan y Boxer, 2024).

Si bien estos resultados son muy prometedores aun es necesario determinar el rescate de sintomatologías en los pacientes más allá de la reducción en los niveles de tau patológica. Una de las desventajas de estas estrategias de silenciamiento de tau es que estas actúan de forma global en el cerebro, sin discriminar entre aquellas regiones que son vulnerables a la patología de las que no lo son. Además, como se describió anteriormente, tau presenta roles fisiológicos como por ejemplo en la actividad eléctrica, por lo que todavía se desconocen los efectos de la disminución globalizada de tau a largo plazo en pacientes (A. Ittner y Ittner, 2018). Otro factor para tener en cuenta es que, tanto los ASOs como las inmunoterapias pasivas se administran mediante punción lumbar, y aunque resultan estrategias seguras en los pacientes por su capacidad de degradación rápida, requieren de inyecciones constantes para mantener su efecto a largo plazo, particularmente en enfermedades neurodegenerativas que implican tratamientos crónicos.

Teniendo en cuenta las evidencias recientes sobre los mecanismos de vulnerabilidad selectiva en las taupatías, así como la relevancia de la acumulación de tau en ciertas regiones por sobre el tipo de agregados patológicos presentes en ellas,

una alternativa a estas estrategias terapéuticas de reducción global podría implicar el silenciamiento localizado de tau en ciertos núcleos o regiones vulnerables del cerebro. Un enfoque que podría tener en cuenta los mecanismos de vulnerabilidad selectiva es la expresión localizada mediante vectores virales de determinadas moléculas que tengan como blanco el ARN mensajero de *MAPT*.

**Estrategia de microARNs artificiales y su expresión mediante vectores virales**

La tecnología de ARNi fue utilizada durante más de 20 años con el fin de regular la expresión génica a nivel postranscripcional, para entender la función de determinados genes, además de ser evaluada con fines terapéuticos (Kotowska-Zimmer et al., 2021). Los distintos ARNs que se pueden utilizar son: siRNAs (por *small interfering RNAs*), shRNAs (por *short harpin ARNs*) y los amiRNAs (por *artificial microRNAs*). Todos estos son diseñados *in silico* y lo que varía entre ellos es el mecanismo de entrega o *delivery* a las células blanco, además del procesamiento al que se encuentran sujetos. Este procesamiento implica el uso de la maquinaria celular de interferencia, propia de los microARNs endógenos, que presenta dos posibles mecanismos de acción: la degradación de un ARN mensajero blanco, o la inhibición de su traducción.

Tanto los shRNAs como los amiRNAs pueden ser expresados dentro de la célula a partir del uso de vectores virales (Kotowska-Zimmer et al., 2021). Los shRNAs de primera generación, generalmente son expresados a partir de promotores reconocidos por la ARN Polimerasa III (ARNPolIII), siendo estos promotores ubicuos y fuertes, por lo que su expresión es constitutiva, independientemente del tipo celular. Estos shRNAs presentan un *stem-loop* y son procesados en un único paso por la ARNasa DICER, formando una secuencia siRNA que se dirige al ARN mensajero blanco. Por otro lado, la segunda generación de shRNAs o también llamados amiRNAs, son generalmente expresados a partir de promotores de ARN Polimerasa II (ARNPolII), por lo que se pueden utilizar promotores sitio-específicos para dirigir su expresión a ciertos tejidos o tipos celulares. Por su expresión y estructura molecular, entran en la vía de biogénesis de microARNs en un paso previo a los shRNAs de primera generación, y son procesados en dos pasos por las enzimas DROSHA y DICER, al igual que la mayoría de los microARNs endógenos de mamíferos. Los amiRNAs se componen por un esqueleto de pri-miRNA (por *primary microRNA*) similar al endógeno, que actúa en el procesamiento y en el transporte de esta molécula, y a su vez sirve de andamio para una secuencia de siRNA que es aquella que se utiliza como guía para dirigirse al ARN mensajero blanco. En este caso, como los niveles de estos siRNAs finales están regulados por la maquinaria endógena, es muy poco probable que ocurra una producción de los amiRNAs por fuera de los rangos fisiológicos; por esto, son

herramientas eficientes y más seguras que otras moléculas de ARNi (Kotowska-Zimmer et al., 2021). Además, al ser expresados mediante vectores virales, los amiRNAs pueden dirigirse a tejidos o tipos celulares particulares mediante el uso de promotores específicos y/o el uso de ciertos serotipos virales en el caso de los adenovirus asociados (AAVs), lo que permite reducir los efectos secundarios o no deseados. También, el uso de vectores virales permite que la expresión de estos sea a largo término, en contraposición con otras moléculas dirigidas al ARN como los ASOs.

La estructura de un amiRNA se compone de un secuencia esqueleto o de andamiaje (*scaffold*) de pri-miRNA y una secuencia guía de siRNA específica del blanco o *target* (Kotowska-Zimmer et al., 2021; Diener et al., 2022). Como la secuencia de andamiaje es aquella que determina el procesamiento y el transporte, y por lo tanto la eficiencia del silenciamiento, es muy relevante que el diseño de esta secuencia sea correcto para prevenir fallas en los distintos pasos de clivaje y la posibilidad de generar otras secuencias siRNA con posibles efectos adversos en otros ARNs mensajeros. Debido a esto, generalmente se suelen utilizar ciertos pri-miRNAs endógenos y ubicuos, de los cuales se conoce muy bien su procesamiento como, por ejemplo: el miRNA-30a, miRNA-155 y miRNA-451 (Figura 12). Estos se han utilizado en modelos de cáncer, virales y de enfermedades neurodegenerativas (Kotowska-Zimmer et al., 2021; Diener et al., 2022).

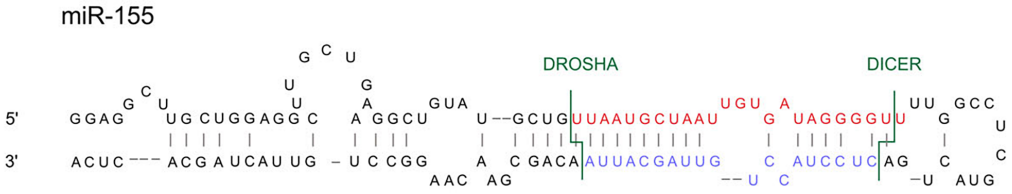



**Figura 12: Pri-miRNA 155 humano.** Este pri-miRNA es muy utilizado para el desarrollo de microARNs artificiales ya que se conoce muy bien cómo es su procesamiento y mecanismo de acción. Conserva gran homología con el de ratón. *Adaptado de Kotowska-Zimmer et al., 2021.*

Todas estas secuencias están formadas por un tallo con una secuencia de ARN doble cadena flanqueada por dos segmentos basales de ARN simple cadena y un bucle apical, para las cuales el mecanismo de procesamiento es similar al de los microARNs endógenos (Figura 13). Los segmentos basales en general varían en su longitud y son necesarios para el reconocimiento del complejo formado por DROSHA, que es la enzima que realiza el primer corte, dejando una molécula de doble hélice con el bucle apical, que se conoce como pre-miRNA (precursor de microARN). Luego, este ARN es exportado del citoplasma al núcleo por exportina-5, que reconoce el bucle apical. Generalmente, este bucle puede variar entre 3-23 nucleótidos y se elimina luego del corte por DICER, formando un dúplex de miRNA. Este dúplex se une a la proteína

Argonauta (AGO1-4) con la ayuda de chaperonas (HSC70/HSP90), formando el complejo RISC (por *RNA-induced silencing complex* en inglés). La elección de aquella cadena que dirija el silenciamiento dependerá de la unión de Argonauta al extremo 5' monofosfato con menor estabilidad de apareamiento de bases (Bartel, 2018). Luego, la cadena o hebra guía dirige al complejo RISC hacia el ARN blanco para su degradación o el silenciamiento de la traducción. Este mecanismo de procesamiento de microARNs es el canónico, pero pueden existir otros que son independientes tanto del procesamiento de DROSHA como de DICER (Bartel, 2018; Kotowska-Zimmer et al., 2021).

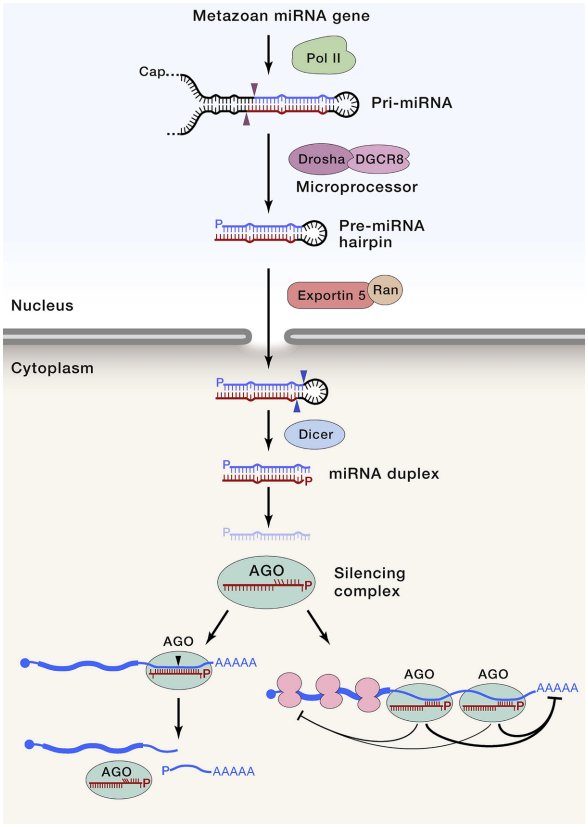



**Figura 13: Mecanismo canónico de biogénesis y formación de microARNs endógenos.** Se resumen los principales pasos del procesamiento de los microARNs, que terminan en la degradación del ARN mensajero blanco (izquierda) o en la inhibición de su traducción (derecha). Este mecanismo es el que utilizan los amiRNAs para su procesamiento. *Adaptado de Bartel, 2018*.

Uno de los ejemplos exitosos del uso terapéutico de los amiRNAs es su aplicación en la enfermedad de Huntington. Mediante el uso del esqueleto del pri-miRNA-451, se adicionó una secuencia siRNA que se dirige contra el exón 1 del ARN mensajero del gen *HTT*, generando un amiRNA que se expresa mediante un AAV. Esta estrategia dirigida específicamente al estriado de distintos modelos *in vivo* ha demostrado ser eficaz en reducir la acumulación de huntingtina (Evers et al., 2018; Spronck et al., 2019) y se encuentra en ensayos clínicos de fase I/II (NCT04120493 en ClinicalTrials.gov).

## HIPOTESIS DE TRABAJO

Dado que el silenciamiento global de tau ha demostrado reducir de manera eficaz diversas especies patológicas de esta proteína, ejercer un efecto protector en contextos de excitotoxicidad y ser bien tolerado en distintos modelos experimentales, y considerando además las evidencias recientes sobre la vulnerabilidad selectiva subyacente a las taupatías, esta investigación plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

**El uso de microARNs artificiales contra tau dirigidos específicamente a regiones vulnerables en las taupatías, será suficiente para reducir la acumulación patológica de tau, así como mitigar los fenotipos asociados a la disfunción en dichas áreas.**

## OBJETIVO GENERAL DE TRABAJO

El objetivo general en el cual se enmarca esta tesis se centra en comprender los mecanismos fisiológicos que subyacen al silenciamiento sitio-específico de tau, analizando sus consecuencias funcionales y su relevancia terapéutica en un modelo preclínico de taupatía, el ratón htau. Para ello, se utilizó una estrategia de expresión pan-neuronal de microARNs artificiales dirigidos contra el ARN mensajero de *MAPT*, que fueron además validados en neuronas humanas diferenciadas como parte de esta investigación.

**Objetivos específicos de este trabajo:**

1- Evaluar la eficacia y consecuencias funcionales de los microARNs artificiales contra tau en un modelo de neuronas humanas diferenciadas *in vitro*.

2- Caracterizar en el modelo murino de taupatía, el ratón htau, el curso temporal de los fenotipos conductuales, metabólicos, electrofisiológicos y moleculares asociados a la disfunción de la corteza prefrontal, región vulnerable en las taupatías primarias.

3- Evaluar la eficacia y consecuencias funcionales de los microARNs artificiales contra tau administrados de forma sitio-dirigida en la corteza prefrontal de ratones htau como prueba de concepto para su potencial uso como herramienta terapéutica.

# RESULTADOS

## 1. Análisis y validación de los Tau-miRNAs en modelos neuronales en cultivo

### *Screening* de los Tau-miRNAs en células SH-SY5Y

A partir del diseño *in silico* de posibles secuencias capaces de prevenir la producción de la proteína tau, se seleccionaron dos secuencias dirigidas a dos regiones diferentes del transcripto maduro de *MAPT*: la secuencia 166, que tiene como blanco la unión de los exones 2/3 y la secuencia 724, que se dirige al exón 11 (Figura 14A). Cada secuencia fue introducida dentro del esqueleto del microARN-155 endógeno de ratón, y cada microARN artificial (amiRNA) se expresó bajo el promotor de sinapsina 1 en vectores lentivirales para transducir estas moléculas en células *in vitro*, con el fin de realizar un *screening* y validación de estas herramientas como potenciales silenciadores de la proteína tau.

El *screening* se realizó en células SH-SY5Y utilizando estos amiRNAs por separado y en combinación equimolar (1:1) con el objetivo de evaluar un posible efecto sinérgico entre ambas moléculas. Como control de la transducción lentiviral se utilizó un amiRNA *scramble* (Scr-miRNA), el cual cuenta con una secuencia siRNA al azar, sin complementariedad con ningún ARN mensajero blanco en humanos ni en ratón. Además, se utilizó como control negativo de la transducción la condición de células no tratadas (NT). Una vez transducidas las células, se esperaron 21 días para medir la reducción en la producción de la proteína tau. Luego, se realizó un ensayo de Western blot a partir del cual se normalizaron los valores obtenidos para los distintos tratamientos sobre la condición NT (Figura 14B-C). El análisis determinó que a pesar de que cada amiRNA silenciaba de forma significativa los niveles de tau total, se produjo un efecto más robusto al utilizar ambos amiRNAs en conjunto. Por lo tanto, se decidió utilizar los amiRNAs en combinación (Tau-miRNAs 166+724) para los experimentos subsiguientes.

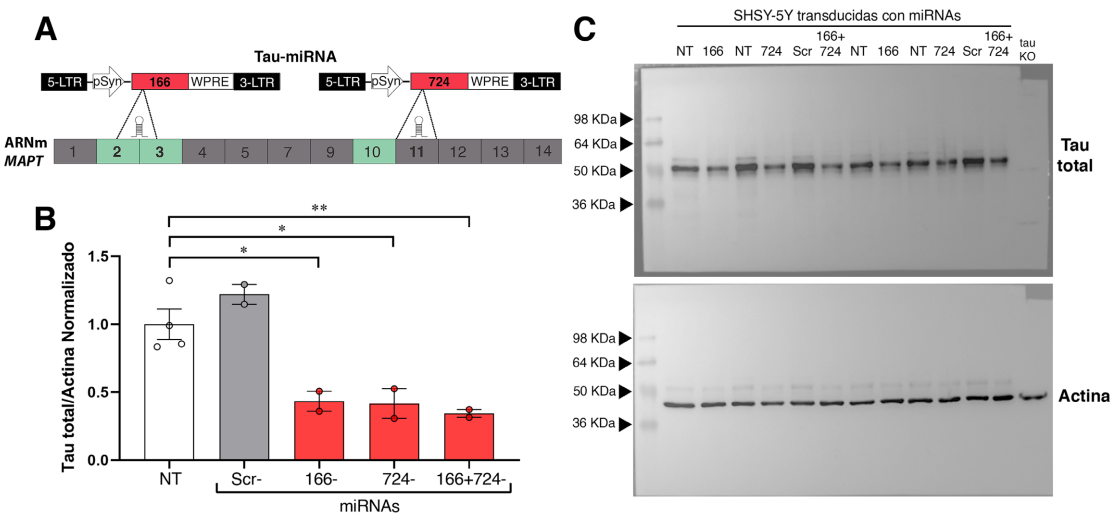



**Figura 14. *Screening* de los amiRNAs contra el ARN mensajero de *MAPT* en células SH-SY5Y. A.** Dos amiRNAs fueron diseñados para dirigirse contra el ARN mensajero de *MAPT*. El Tau-miRNA166 se dirige a la unión entre los exones 2 y 3, mientras que el Tau-miRNA724 tiene como blanco el exón constitutivo número 11. **B-C. B.** Cuantificación del contenido de tau total a partir de las membranas mostradas en **C.** La marcación de actina fue utilizada como control de carga. NT: células sin transducir. tau KO: control negativo para la marcación de tau. NT n=4, Scr-miRNA n=2, Tau-miRNA166 n=2, Tau-miRNA724 n=2, Tau-miRNAs166+724 n=2. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. **p*<0,05, ***p*<0,01.

## Validación de la eficiencia de los Tau-miRNAs en neuronas humanas *in vitro* derivadas de células madre pluripotentes inducidas (hiPSC)

Con el objetivo de analizar la eficiencia del silenciamiento de tau, se realizó la transducción de los Tau-miRNAs en neuronas humanas diferenciadas *in vitro* a partir de células pluripotentes inducidas (hiPSC, por sus siglas en inglés). Este trabajo se realizó en colaboración con el Laboratorio de Transporte Axonal y Enfermedades Neurodegenerativas, a cargo del Dr. Tomás Falzone. En el marco de esta colaboración, se siguió el siguiente esquema de trabajo: 1) diferenciación de neuronas hasta lograr su polarización estructural y expresión de altos niveles de marcadores neuronales como βIII-tubulina y tau, así como una reducción significativa en el número de células expresando marcadores de progenitores neurales como nestina (Figura 15A-B); 2) transducción de los Tau-miRNAs en el día *in vitro* 14 (DIV14) y su expresión durante 21-23 días, teniendo en cuenta la cinética de recambio de la proteína tau (Sato et al., 2018); 3) ensayos de *live-imaging* para medir el transporte axonal, registros de *patch-clamp*, inmunofluorescencia y recolección de ARN o proteína para ensayos de PCR cuantitativa o Western blot, respectivamente (DIV35 o 37). Para medir la eficiencia de la transducción se utilizaron como control partículas lentivirales que producían la proteína fluorescente dsRED (Figura 15C). Adicionalmente, para los experimentos de *live-imaging*, se realizó una transfección de las neuronas al DIV35 con un vector que

expresaba la proteína de fusión APP-YFP para registrar y analizar el transporte axonal de vesículas marcadas fluorescentemente, las cuales dependen principalmente del transporte anterógrado ejercido por kinesina-1 y retrógrado por dineína (Figura 15D).

Para validar el silenciamiento de tau en neuronas diferenciadas tratadas con los Tau-miRNAs, se realizó un ensayo de PCR cuantitativa en el cual se detectó una disminución significativa en los niveles del ARN mensajero de *MAPT* normalizados a la condición control (Figura 15E). Además, la transducción con los Tau-miRNAs resultó en una reducción de aproximadamente un 75% de los niveles de la proteína de tau (Figura 15F-G).

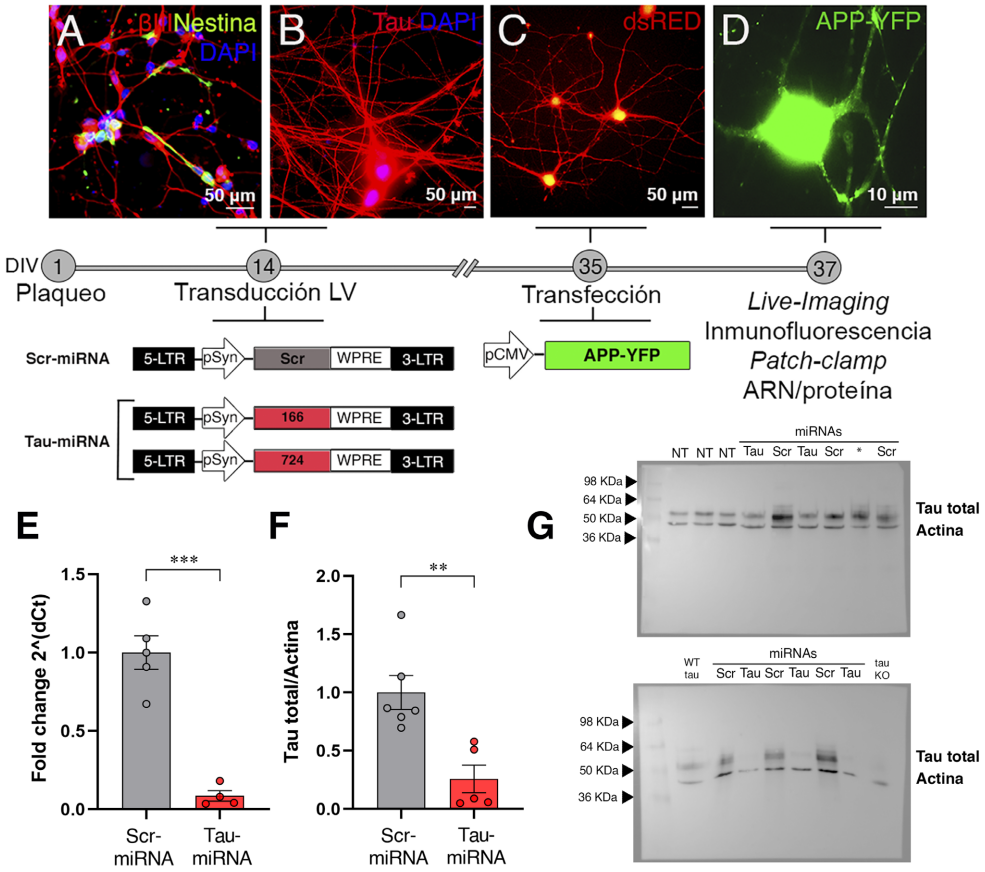



**Figura 15. Validación de los amiRNAs contra el ARN mensajero de *MAPT* en neuronas humanas diferenciadas. A-D.** Diseño experimental. Los cultivos neuronales polarizados en el DIV14 se marcaron contra βIII-tubulina y nestina (**A**, en rojo y verde respectivamente) así como contra tau (**B**, en rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (en azul). Las neuronas fueron transducidas con vectores lentivirales que contenían Scr-miRNA o una combinación equimolar de los Tau-miRNAs (166+724) y se co-transdujeron con un vector lentiviral que expresaba la proteína fluorescente dsRED. Luego de 3 semanas de expresión (al DIV35), la transducción lentiviral se confirmó por la fluorescencia de dsRED (**C**) y las neuronas fueron transfectadas con un plásmido que expresaba la proteína de fusión APP-YFP para realizar los experimentos de *live-imaging* al DIV37 (**D**). **E.** Cambios en la expresión del ARN mensajero de *MAPT*, utilizando *GAPDH* como control interno. Scr-miRNA n=5, Tau-miRNA n=4. **F-G.** Niveles de tau total normalizados y cuantificados (**F**) a partir de las membranas en **G**. La marcación de actina fue utilizada como control de carga. NT: células sin transducir. tau KO: control negativo para la marcación de tau. *: o*utliers* no incluidos en el análisis. Scr-miRNA n=6, Tau-miRNA n=5. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM, *t-test* paramétrico. ***p*<0,01, ****p*<0,001.

**Análisis del efecto de los Tau-miRNAs: morfología y transporte axonal**

La proteína tau ha sido descripta por tener un rol muy importante en la estabilidad de los microtúbulos (Morris et al., 2011), sin embargo, algunos trabajos han demostrado que la ablación o el silenciamiento de tau no ha tenido un efecto significativo en el transporte axonal en modelos *in vitro* e *in vivo* (Chang, Shao, et al., 2021). Con el objetivo de elucidar las posibles consecuencias funcionales de la reducción de tau, se evaluaron los efectos de los Tau-miRNAs en la morfología y el transporte axonal de las neuronas humanas diferenciadas. Por un lado, mediante un análisis de Scholl (Ver Materiales y Métodos), se midió el impacto del silenciamiento de tau en la estructura general y polarización neuronal, al determinar el número de procesos de las neuritas y su arborización a distancias crecientes desde el soma (Figura 16A-B). Los resultados demostraron que tanto el grupo Scr-miRNA como Tau-miRNA presentaban niveles similares de arborización, por lo que la disminución en los niveles de tau no afectó significativamente la morfología general de las neuronas humanas diferenciadas.

Adicionalmente, se evaluó el efecto del silenciamiento de tau sobre el transporte axonal a través del análisis de la dinámica de vesículas marcadas con APP-YFP visualizadas mediante *live-imaging* (Figura 16C, Ver Materiales y Métodos). La proporción de partículas moviéndose en dirección anterógrada o en dirección retrógrada, así como aquellas en estado estacionario no se modificaron con el tratamiento de los Tau-miRNAs (Figura 16D), indicando que el silenciamiento de tau no altera la proporción del flujo general de las vesículas de APP. Sin embargo, se observó un aumento en la densidad de partículas al reducir los niveles de tau, lo cual sugiere que se favorecería un reclutamiento de un mayor número de vesículas al axón en el grupo tratado con los Tau-miRNAs (Figura 16E).

En conclusión, a pesar de las modificaciones detectadas, la reducción de la proteína tau no generó cambios sustanciales en la morfología y en la dinámica del transporte axonal de las neuronas humanas diferenciadas.

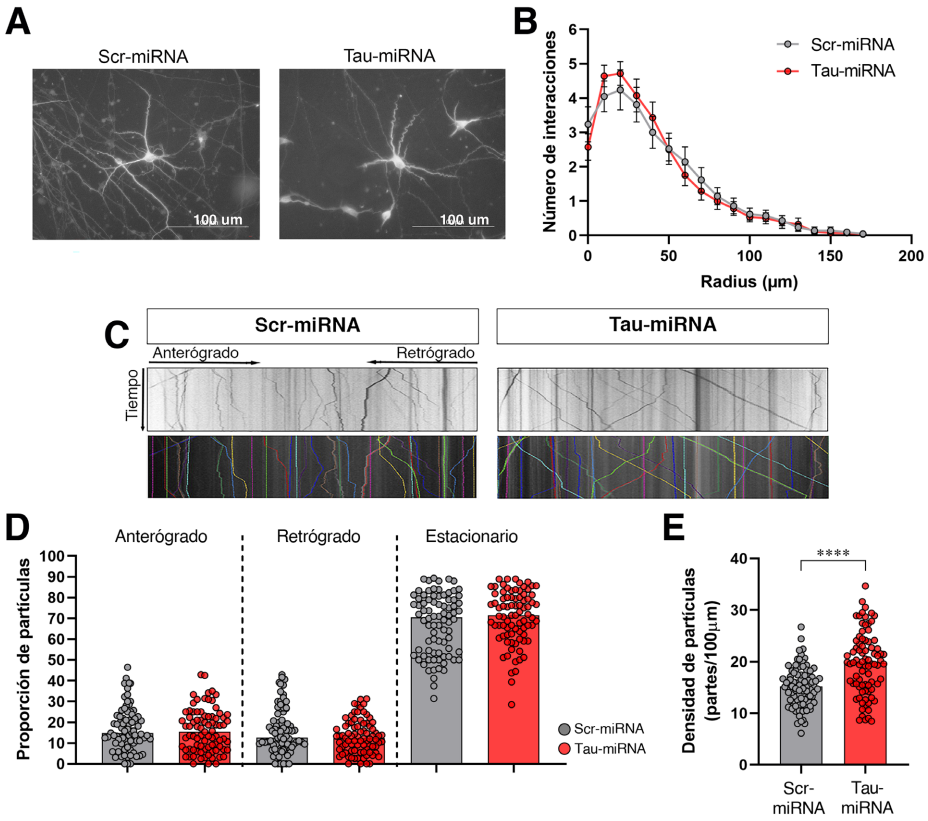



**Figura 16. Análisis del efecto de los Tau-miRNAs en la morfología neuronal y el transporte axonal de neuronas humanas diferenciadas. A-B.** Análisis de Scholl. **A.** Imágenes representativas de la arborización neuronal. **B.** Cuantificación de las intersecciones de las proyecciones sobre el radio (en micrómetros). Scr-miRNA n=21, Tau-miRNA n=28. **C-E.** Ensayos de dinámicas de transporte axonal por *live-imaging*. **C.** Gráficas de movimiento (kimogramas) registradas en los axones de las neuronas transfectadas con APP-YFP. Las líneas en color indican las trayectorias detectadas. **D.** Proporción de vesículas de APP con transporte anterógrado, retrógrado y en estado estacionario. **E.** Densidad total de partículas, calculadas cada 100 um de largo axonal. Scr-miRNA n=82, Tau-miRNA n=83. Para el gráfico B, puntos dispersión con promedio ± SEM, prueba de Kolmogórov-Smirnov. Para los gráficos D y E, puntos de dispersión con mediana, Mann-Whitney *U-test*. ****$p$<0,0001.

## Análisis del efecto de los Tau-miRNAs: actividad eléctrica y posición del segmento inicial del axón

A partir de la evidencia reciente que ha demostrado que el silenciamiento y la ablación genética de la proteína tau generan cambios en la excitabilidad neuronal *in vivo* (Roberson et al., 2007; Ittner et al., 2010; DeVos et al., 2013; Holth et al., 2013; Gheyara et al., 2014; Bi et al., 2017; Chang, Evans, et al., 2021), se analizó si el tratamiento con los Tau-miRNAs podría tener un efecto sobre la actividad eléctrica de las neuronas humanas diferenciadas (Anexo 1). Para esto, a partir de una colaboración con el Laboratorio de Circuitos Neuronales, a cargo de la Dra. Antonia Marin Burgin, becarios de su grupo realizaron registros electrofisiológicos de *patch-clamp* en las neuronas humanas maduras control o tratadas con los Tau-miRNAs. En la evaluación de las propiedades electrofisiológicas de la membrana, no se observaron diferencias significativas en la resistencia de entrada ni en el *threshold* o umbral necesario para el

disparo del potencial de acción (PA) entre los tratamientos (Anexo 1B-C). Esto indicaría que las propiedades de membrana en el reposo no se modificaron frente al silenciamiento de tau en las neuronas humanas diferenciadas. Sin embargo, se detectó una disminución en la amplitud del PA para el grupo tratado con los Tau-miRNAs (Anexo 1D), la cual fue acompañada de una reducción significativa en el número de potenciales de acción generados a inyecciones crecientes de corriente (Anexo 1E-F). Asimismo, se realizaron registros en la configuración de *voltage-clamp* con el fin de analizar las corrientes de $Na^+$ y $K^+$ en las neuronas humanas diferenciadas. Los valores de corriente obtenidos para ambas corrientes fueron significativamente menores para el tratamiento con los Tau-miRNAs en comparación con el grupo Scr-miRNA (Anexo 1G-I).

Por otro lado, se ha descripto anteriormente que la posición del segmento inicial del axón (AIS, por sus siglas en inglés) se relocaliza como respuesta homeostática a cambios en la excitabilidad neuronal, es decir, que frente a una actividad eléctrica aumentada el AIS se aleja del soma, reduciendo así las probabilidades de disparo del potencial de acción, en un proceso reversible (Grubb y Burrone, 2010). Evidencias recientes demuestran que la proteína tau estaría vinculada en el ordenamiento del AIS, ya que la ausencia de tau (Chang, Evans, et al., 2021) o la presencia de tau patológica (Hatch et al., 2017b; Sohn et al., 2019) generaron cambios en su posición o en su longitud, además de afectar la actividad neuronal. Asimismo, se ha demostrado anteriormente que tau interacciona con componentes del AIS, los cuales actúan como una barrera de difusión que regulan su tráfico y favorecen su localización axonal (Li et al., 2011).

Con el objetivo de comprender mejor los efectos del silenciamiento de tau en la actividad eléctrica de las neuronas diferenciadas, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para determinar si el tratamiento con los Tau-miRNAs afectaba la dinámica del AIS, a través de la marcación de la proteína anquirina G (Figura 17). El silenciamiento de tau disminuyó significativamente la distancia del AIS al soma (Figura 17A-B) y aumentó su longitud (Figura 17A y C) con respecto al grupo Scr-miRNA. Este efecto podría interpretarse como una compensación adaptativa de las neuronas tratadas con los Tau-miRNAs frente al descenso de la actividad eléctrica. Sin embargo, no se podría descartar la posibilidad de que la reducción en los niveles de tau module *per se* la organización del AIS. En conclusión, el silenciamiento de tau por el tratamiento con los Tau-miRNAs, reduce la actividad eléctrica en neuronas diferenciadas *in vitro* y modula tanto la posición como la longitud del AIS.

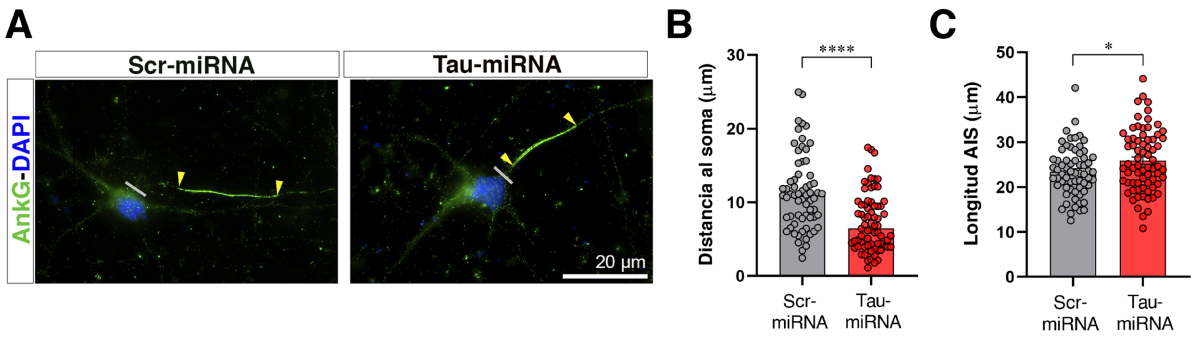



**Figura 17. Análisis del efecto de los Tau-miRNAs en la posición y la longitud del AIS en neuronas humanas diferenciadas. A.** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia del AIS a través de la tinción de anquirina G (AnkG, en verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (en azul). **B-C.** Cuantificación de la distancia al soma (**B**, *desde la línea hasta la primera flecha en A)* y la longitud (**C**, *distancia entre flechas en A*) del AIS. Scr-miRNA n=65, Tau-miRNA n=71. Para el gráfico B, datos representados como puntos de dispersión con mediana, Mann-Whitney *U-test*; mientras que para C se grafican los puntos de dispersión con promedio ± SEM; *t-test* paramétrico. **p*<0,05, *****p*<0,0001.

En esta sección, se ha demostrado que el tratamiento con los Tau-miRNAs en neuronas humanas diferenciadas a partir de células pluripotentes, permite reducir de forma efectiva los niveles de tau, demostrando la unión a su blanco (o *target engagement*, en inglés). El silenciamiento de tau si bien no ha afectado sustancialmente la morfología y el transporte axonal en estas neuronas, ha generado una reducción significativa en su actividad eléctrica. Estos cambios observados fueron acompañados de una disminución en la distancia al soma y un aumento en la longitud del AIS, estructura que presenta plasticidad en respuesta a la actividad eléctrica y ha demostrado interaccionar con la proteína tau en trabajos anteriores. Esta caracterización de los Tau-miRNAs y el análisis de sus consecuencias funcionales, permitieron validar la eficacia de estas moléculas para proceder a los experimentos *in vivo*, en un modelo murino de taupatía.

## 2. Caracterización del curso temporal de fenotipos moleculares, electrofisiológicos, metabólicos y comportamentales en el ratón htau como modelo murino de taupatía

Con el objetivo final de evaluar los Tau-miRNAs como herramienta terapéutica y realizar una prueba de concepto, decidimos utilizar un modelo murino de taupatía, el ratón htau. Para esto fue necesario inicialmente analizar el curso temporal de los fenotipos del modelo, a fin de establecer las posibles ventanas de intervención terapéuticas. En esta sección se describirán los resultados obtenidos durante la caracterización y la puesta a punto de técnicas de detección de fenotipos comportamentales, electrofisiológicos, metabólicos y moleculares del modelo en estudio. El ratón htau desarrolla distintos fenotipos asociados a la acumulación patológica de tau como ha sido descripto anteriormente (Andorfer et al., 2005; Polydoro et al., 2009). En nuestro laboratorio se han caracterizado ampliamente los déficits comportamentales de este modelo en ratones envejecidos, asociados a fenotipos moleculares tales como los cambios en el *splicing* alternativo del exón 10 de *MAPT* y la fosforilación patológica de la treonina 231 de tau (marcada con el anticuerpo AT180) en distintas estructuras del cerebro (Espíndola et al., 2018; Damianich et al., 2021). Además, se ha observado en ensayos de inmunohistoquímica a los 12 meses de edad, que la región con mayor acumulación de tau es la corteza prefrontal (PFC) comparada con otras estructuras como el hipocampo, el estriado y la *substancia nigra*. Adicionalmente, se ha demostrado previamente por Western blot que la marcación de AT180 en esta estructura aumenta progresivamente con la edad, siendo detectada a partir de los 6 meses (Espíndola et al., 2018).

La PFC es considerada el mayor centro de integración neuronal en el cerebro, cuya función es la representación y ejecución de acciones mediadas o dirigidas por objetivos. Esto lo logra a partir de funciones ejecutivas como la planificación, la toma de decisiones, la memoria de trabajo, la anticipación y el control inhibitorio (Fuster, 2015). En la FTLD, particularmente para la bvFTD, una de las regiones que presentan mayor atrofia es la corteza prefrontal, la cual correlaciona con las conductas observadas en los pacientes: desinhibición, apatía, presencia de comportamientos motores aberrantes, deterioro cognitivo, déficit de atención y pérdida de la memoria de trabajo (Rabinovici y Miller, 2010).

En este trabajo de tesis, decidimos realizar una exhaustiva caracterización fenotípica a distintas edades en el ratón htau, analizando parámetros moleculares, metabólicos, electrofisiológicos y comportamentales relacionados a disfunciones en la

PFC, por ser esta una región vulnerable al inicio de la patología de tau en este modelo (Espíndola et al., 2018). Además, esta caracterización en el ratón htau permitió discriminar la edad a partir de la cual se inician la mayoría de los fenotipos patológicos o, dicho de otra manera, establecer su *onset* fenotípico, a fin de poder optimizar la subsiguiente intervención terapéutica con los Tau-miRNAs.

**Curso temporal de fenotipos cognitivos**

Diversos modelos de taupatía han demostrado fenotipos comportamentales asociados al deterioro cognitivo y la hiperactividad (Götz y Götz, 2019, pp. 381-392), incluido el ratón htau (Polydoro et al., 2009). Por lo tanto, en este estudio, se realizó una batería de ensayos de comportamiento asociados a la PFC y validados anteriormente en nuestro grupo de trabajo que incluían (Espíndola et al., 2018; Damianich et al., 2021; Muñiz et al., 2022): Ensayo de Campo abierto (*Open Field*, OF), Laberinto en cruz elevado (*Elevated Plus Maze*) y Reconocimiento de objeto novedoso (*Novel Object Recognition*, NOR). Para estos ensayos se utilizaron cohortes de ratones htau y su contrapartida *wild-type* (WT), los cuales se analizaron sucesivamente a las edades de 3, 6, 9 y 12 meses (Figura 18A).

Se analizó la distancia recorrida en la prueba de campo abierto para determinar la locomoción espontánea y las trayectorias realizadas como indicador del comportamiento exploratorio en un ambiente novedoso. Se observó que los ratones htau presentaron un leve aumento en su locomoción espontánea, el cual resultó estadísticamente significativo solo a los 3 y 12 meses de edad (Figura 18B). Seguidamente, se midieron fenotipos asociados con la desinhibición comportamental. Para ello, se analizó en el mismo ensayo de campo abierto el porcentaje de tiempo para el cual los ratones exploraban el centro de la arena, respecto de la periferia. En este caso, el tiempo transcurrido en el centro de la arena resultó mayor para el grupo htau a los 3 y 6 meses de edad, mientras que a edades mayores estos fenotipos desaparecieron (Figura 18C). Para complementar estos resultados y poder tener otra medida de estos fenotipos relacionados a la desinhibición comportamental, se realizó el ensayo de laberinto en cruz elevado. En esta prueba, los ratones htau de 3 y 6 meses presentaron mayor tiempo en los brazos abiertos respecto a los WT, en tanto que no se observaron diferencias significativas entre los 6 y 12 meses (Figura 18D). Estos resultados son consistentes con el análisis de campo abierto, por lo que se podría concluir que los ratones htau únicamente presentan fenotipos de desinhibición comportamental a edades tempranas (entre 3 y 6 meses de edad).

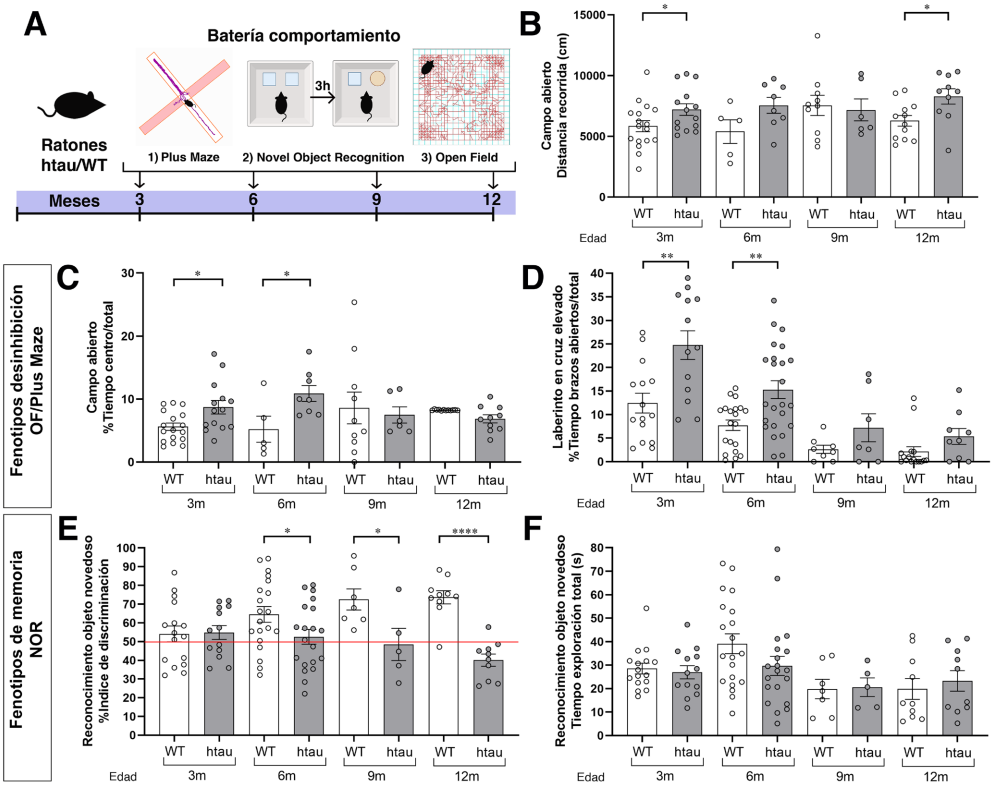



**Figura 18. Curso temporal de los déficits cognitivos en el ratón htau. A.** Se utilizaron ratones htau y WT de 3, 6, 9 y 12 meses de edad en una batería de ensayos de comportamiento asociados a la PFC. Se muestra el orden en que se realizaron los ensayos del 1 al 3. **B-C.** Distancia total recorrida **(B)** y porcentaje de tiempo de exploración en el centro relativo al tiempo total **(C)** en la prueba de campo abierto (OF). 3m: WT n=17, htau n=14; 6m: WT n=5, htau n=8; 9m: WT n=10, htau n=6; 12m: WT n=12, htau n=10. **D.** Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos relativo al tiempo de exploración total en el ensayo de laberinto en cruz elevado (Plus Maze). 3m: WT n=15, htau n=13; 6m: WT n=20, htau n=24; 9m: WT n=8, htau n=7; 12m: WT n=16, htau n=9. **E-F.** Índice de discriminación **(E)** y tiempo de exploración total **(F)** en la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (NOR). 3m: WT n=16, htau n=13; 6m: WT n=20, htau n=20; 9m: WT n=7, htau n=5; 12m: WT n=10, htau n=10. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; *t-test* paramétrico. **p*<0,05, ***p*<0,01, *****p*<0,0001.

Luego se realizó la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (NOR), con el fin de evaluar el rendimiento cognitivo en los ratones htau. En este caso, se utilizó un paradigma asociado a la memoria de corto plazo, el cual se ha utilizado anteriormente en el laboratorio para evaluar la función de la PFC en el modelo htau (Espíndola et al., 2018). En este ensayo, se midió el índice de discriminación para determinar el porcentaje de tiempo que el ratón le dedicó a examinar el objeto novedoso con respecto al tiempo total de exploración de ambos objetos (ver Materiales y Métodos). Los resultados demostraron que, a partir de los 6 meses, los ratones htau presentan una disminución significativa en su índice de discriminación con respecto al grupo control, que además persiste hasta los 12 meses de edad (Figura 18E). Asimismo, desde los 6 meses el valor promedio del grupo htau se mantuvo alrededor del 50% para este índice (línea roja en la Figura 18E), indicando que estos no tienen preferencia por explorar el

objeto novedoso o familiar, lo cual permite concluir que estos animales presentan un deterioro cognitivo a partir de esta edad. Como control del experimento de NOR, se analizó el tiempo de exploración total y no se observaron diferencias significativas entre el grupo htau y WT a lo largo de las distintas edades (Figura 18F), indicando que las diferencias observadas en el índice de discriminación no se deben a cambios en la actividad exploratoria y/o la motivación de los animales.

**Curso temporal de la captación de 18F-FDG por microPET**

Luego de caracterizar y determinar ciertos fenotipos comportamentales en el ratón htau asociados a la PFC, se evaluó el metabolismo de glucosa en esta estructura de forma indirecta, a través del análisis de la captación de 18F-fluorodeoxiglucosa por tomografía de emisión de positrones (FDG-microPET, estudio realizado en el Centro de Imágenes Moleculares-FLENI). Este análisis ha sido utilizado como correlato de actividad y muerte neuronal en el diagnóstico temprano de pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Teune et al., 2010) y en modelos de taupatía (Endepols et al., 2022). Para este ensayo, se realizaron las mediciones en ratones htau y WT a 3, 6, 9 y 12 meses de edad y se analizó el curso temporal de los cambios entre las distintas edades para cada genotipo. Debido a que los cambios en la captación de 18F-FDG fueron determinados a partir de la comparación entre edades (Figura 19), para algunas regiones se puede observar una mayor captación de 18F-FDG (marcación de rojo hacia amarillo) y en otros casos una menor captación de 18F-FDG (marcación de azul a celeste).

Entre los 3 y 6 meses de edad, se observó tanto para ratones htau como WT un marcado incremento en la captación de 18F-FDG en regiones corticales (Figura 19, primera columna). Estos resultados sugieren indirectamente un aumento en el metabolismo de glucosa, lo cual se esperaría que esté relacionado con una mayor actividad cortical en ratones adultos jóvenes comparados con los animales de 6 meses. Sin embargo, en el grupo htau se observa que, para edades mayores a 6 meses, la captación de 18F-FDG en la PFC (particularmente en la región prelímbica, marcada con círculos rojos) decae significativamente con la edad, mientras que en el grupo control no hay cambios detectables en esta región (Figura 19, segunda columna). Además, se observa para los ratones htau, que este decaimiento es aún más significativo a los 12 meses de edad (Figura 19, tercera columna). Por lo tanto, se concluye que a partir de los 6 meses los ratones htau presentan un decaimiento progresivo en la captación de 18-FDG en la PFC que depende de la edad, e indirectamente se encuentra asociado a un menor metabolismo de glucosa en esta región del cerebro.

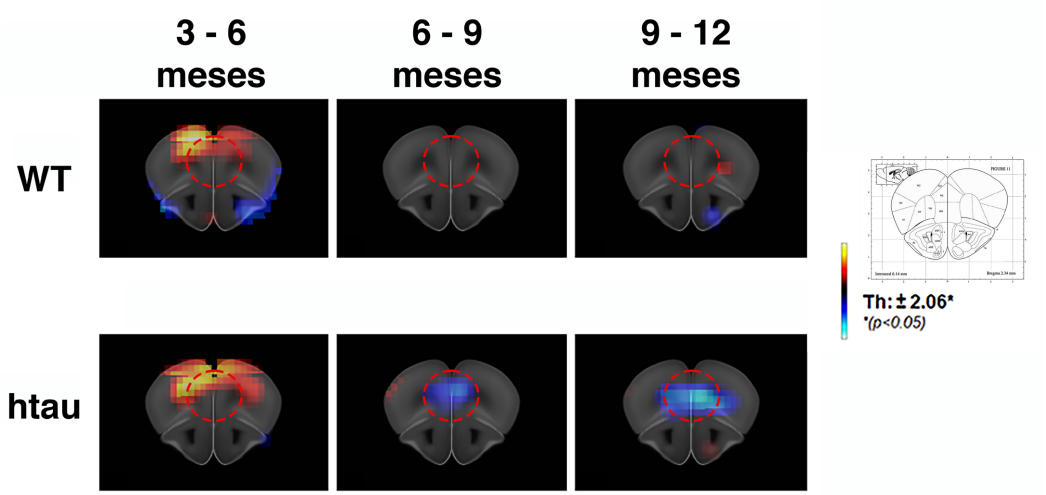



**Figura 19. Curso temporal de la captación de 18F-FDG por microPET en el ratón htau.** En las imágenes se muestran secciones coronales que muestran los cambios en la captación de 18F-FDG en la PFC, al analizar cohortes de ratones htau y WT de 3, 6, 9 y 12 meses de edad por microPET. WT n=11, htau n=9. Las imágenes muestran los resultados del análisis estadístico de *t-test*, comparando para un mismo genotipo la medición a una edad respecto de la medición a la edad anterior. Los cambios significativos (*$p$<0,05) se representan con colores, utilizando la escala colorimétrica de la derecha. La escala del rojo al amarillo representa incrementos en la captación de 18F-FDG, mientras que el azul a celeste representa disminuciones en la captación de 18F-FDG.

### Curso temporal de registros electrofisiológicos de campo en la corteza prefrontal

A partir de la observación de cambios significativos en la captación de 18F-FDG en el ratón htau, y en base a evidencias que indican cambios en la actividad neuronal en otros modelos animales asociados a la acumulación patológica de tau (Crimins et al., 2012; García-Cabrero et al., 2013; Wheeler et al., 2015; Maeda et al., 2016), nos interesó analizar la actividad eléctrica a lo largo del envejecimiento en la PFC del modelo htau. Para esto, se realizaron registros electrofisiológicos de campo *in vivo* a cargo del Dr. Ezequiel Pereyra, becario posdoctoral de nuestro grupo de trabajo. Estos registros se realizaron en cohortes de ratones htau y WT de 3, 6 y 12 meses de edad y se focalizaron particularmente en la corteza prelímbica, por ser la región en la cual se había observado el decaimiento significativo en la captación de 18F-FDG en el modelo htau. A través de la forma promedio obtenida para cada disparo registrado (ver Materiales y Métodos), se discriminaron las neuronas piramidales putativas (pPIR, Figura 20A en rojo) de las interneuronas (pINT, Figura 20A en azul). Al estudiar la proporción de neuronas piramidales e interneuronas según el genotipo a lo largo de las edades registradas, se detectó que las proporciones para cada subtipo neuronal se mantuvieron similares, aunque se puede observar una pequeña disminución en las neuronas piramidales en el grupo htau de 12 meses (Figura 20A, panel del medio).

Al determinar la tasa de disparos de las neuronas piramidales para las distintas edades, se observó un aumento significativo para el grupo htau a los 12 meses (Figura 20B). Estos resultados fueron consistentes con reportes previos en los cuales la sobreexpresión de tau normal o patológica produce un aumento en la actividad neuronal (Crimins et al., 2012; García-Cabrero et al., 2013; Wheeler et al., 2015; Maeda et al., 2016). Cabe mencionar que, a pesar de no ser significativa, a los 6 meses de edad del ratón htau se observó una tendencia hacia una mayor actividad eléctrica en este subtipo neuronal.

Por otro lado, los análisis de la tasa de disparos de las interneuronas no revelaron diferencias a lo largo de las edades (Figura 20C). En conjunto, estos resultados permiten concluir que, en los registros de campo *in vivo*, las neuronas piramidales de la corteza prelímbica en los ratones htau aumentan su tasa de disparos entre los 6 a 12 meses respecto de los ratones WT de la misma edad.

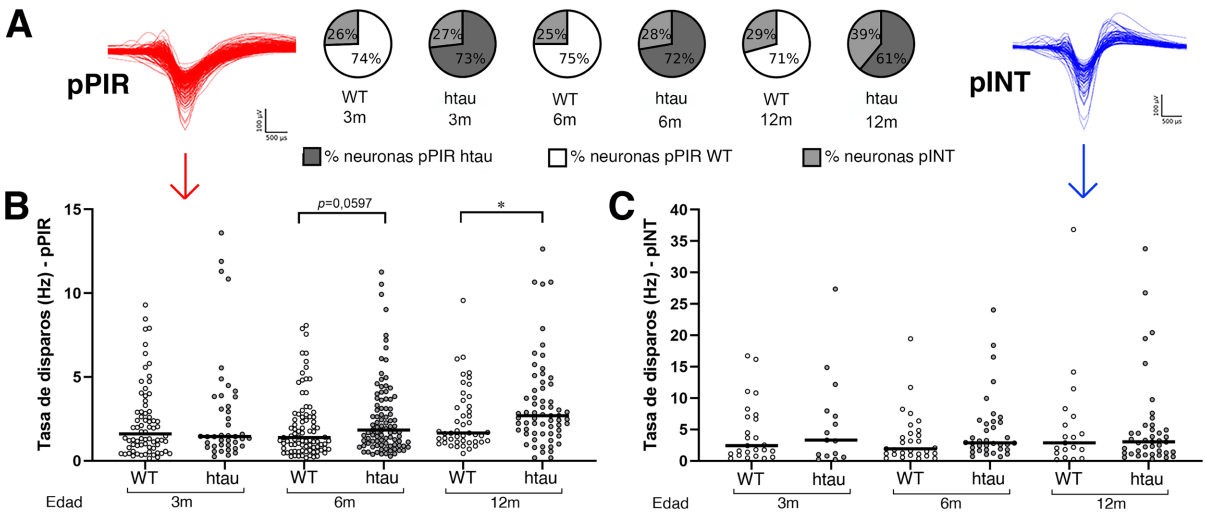



**Figura 20. Curso temporal de los disparos de las neuronas de la PFC en registros de campo *in vivo* en el modelo htau. A.** Gráficos de tortas mostrando la proporción relativa de neuronas piramidales putativas (pPIR, trazas representativas en rojo) y de interneuronas putativas (pINT, trazas representativas en azul) en la PFC de ratones htau y WT registrados a 3, 6 y 12 meses de edad a través de registros electrofisiológicos de campo *in vivo*. La discriminación entre tipos neuronales fue determinada a través del promedio de la forma del disparo. Ratones n: 3m: WT=4, htau=3; 6m: WT=4, htau=4; 12m: WT=3, htau=6. **B.** Curso temporal de la tasa de disparos para las pPIR. Neuronas n: 3m: WT=72, htau=41; 6m: WT=87, htau=94; 12m: WT=46, htau=63. **C.** Curso temporal de la tasa de disparos para las pINT. Neuronas n: 3m: WT=25, htau=15; 6m: WT=29, htau=36; 12m: WT=19, htau=41. Para los gráficos B y D, cada punto representa el promedio de la tasa de disparos para cada neurona registrada a lo largo de la sesión. Las líneas negras representan la mediana para cada grupo. Mann-Whitney *U-test*. **p*<0.05.

## Caracterización de los niveles de tau insoluble en la corteza prefrontal

A fin de determinar si la acumulación de tau patológica es previa, posterior o concomitante a la aparición de los fenotipos conductuales, metabólicos y

electrofisiológicos, se procedió a analizar de manera directa el curso temporal de la acumulación de tau insoluble en la PFC del modelo htau. Para este fin se realizó un fraccionamiento de proteínas extraídas de la PFC a los 3 y 6 meses de edad, utilizando el método de sarkosyl y posterior análisis por Western blot para determinar el contenido de tau insoluble. Se observó que en los ratones htau hay presencia de tau insoluble a partir de los 3 meses y además estos niveles se mantienen a los 6 meses de edad (Figura 21A-B), tal como se había descripto anteriormente para este modelo (Andorfer et al., 2003). Se utilizaron muestras de PFC de htau y WT de 12 meses como control positivo y negativo respectivamente, por resultados previos de nuestro grupo de trabajo (Espíndola et al., 2018).

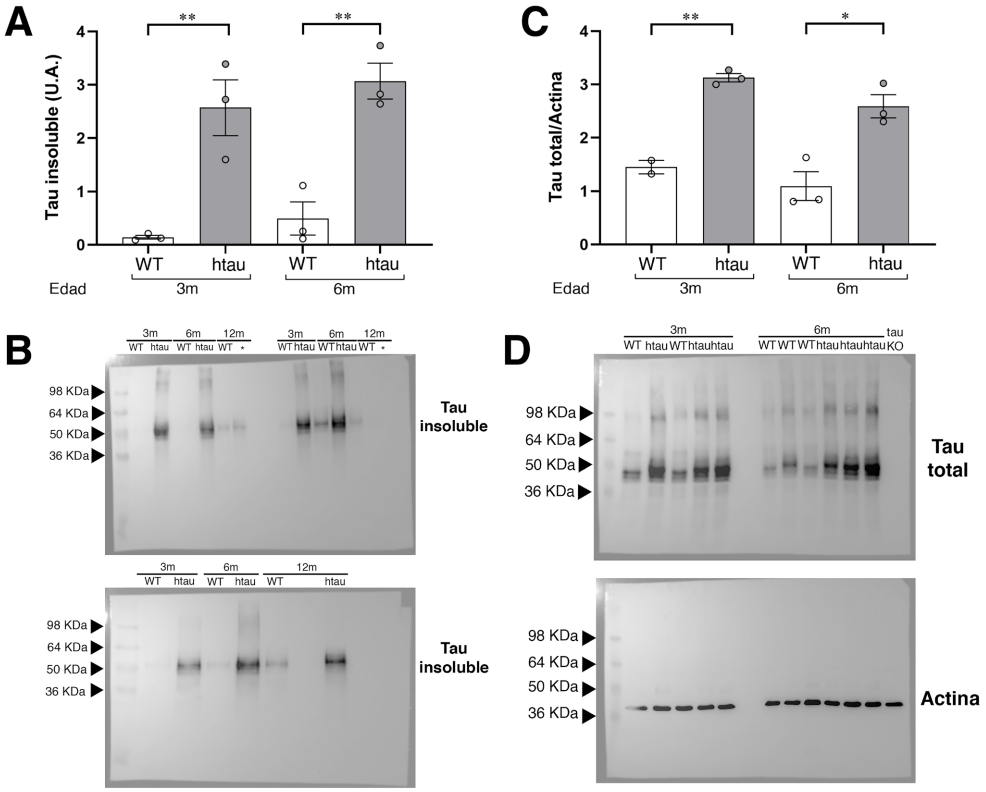



**Figura 21. Caracterización temporal de los niveles de tau insoluble y tau total en la PFC del ratón htau. A-B.** Niveles de tau insoluble fraccionada por el reactivo de sarkosyl en la PFC de ratones htau y WT de 3 y 6 meses de edad. Control positivo: htau 12 meses. Control negativo: WT 12 meses. **A.** Cuantificación del contenido de tau insoluble a partir de las membranas en **(B)**. *: outliers no incluidos en el análisis. 3m: WT n=3, htau n=3; 6m: WT n=3, htau n=3; 12m: WT n=3, htau n=1. **C-D.** Niveles de tau total en la PFC de ratones htau y WT de 3 y 6 meses de edad. **C.** Cuantificación del contenido de tau total a partir de las membranas en **(D)**, utilizando actina como control de carga. tauKO: control negativo para la marcación de tau. 3m: WT n=2, htau n=3; WT 6m n=3, htau 6m n=3. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; *t-test* paramétrico. **p*<0,05, ***p*<0,01.

Asimismo, como control, se analizaron los niveles de tau total a partir del extracto inicial de proteína de la PFC. A los 3 y 6 meses se puede ver una mayor producción de la proteína tau (aproximadamente 2-3 veces) comparada con el grupo control (Figura 21C-D), tal como se ha determinado previamente en el modelo (Espíndola et al., 2018).

En conjunto, los resultados presentados en esta sección indican que la acumulación de tau en la corteza prefrontal del ratón htau precede a la aparición de los fenotipos metabólicos, electrofisiológicos y conductuales, lo cual sugiere que estos estarían ligados a la presencia de tau insoluble. Asimismo, estos resultados confirman que la PFC es una región del cerebro particularmente vulnerable a tau patológica en este modelo. A partir de la caracterización temporal del modelo htau, observamos que a pesar de haber presencia de tau insoluble en la corteza prefrontal desde los 3 meses de edad, la mayoría de los fenotipos asociados a las disfunciones de esta estructura comienzan alrededor de los 6 meses. Por lo tanto, se determinó a los 6 meses como la edad de inicio de la patología tau (*onset* en inglés) en la corteza prefrontal del ratón htau. En base a estos resultados, se procedió a realizar el diseño experimental de la estrategia terapéutica utilizando los Tau-miRNAs de forma presintomática o postsintomática, tal como se describirá en la siguiente sección.

## 3. Evaluación de los Tau-miRNAs como herramienta terapéutica en el modelo murino de taupatía htau

### 3.A. Tratamiento temprano y sitio-específico de tau mediante los Tau-miRNAs en el ratón htau para la prevención del desarrollo de fenotipos asociados a taupatías

Una vez determinado el *onset* fenotípico en el ratón htau a los 6 meses de edad, se realizaron inyecciones sitio-específicas de los Tau-miRNAs en la corteza prefrontal medial (mPFC) en este modelo de forma previa a la aparición de los fenotipos asociados a la patología de tau. Para este fin, de manera preventiva, se inyectaron ratones htau y WT (machos y hembras) a los 3 meses de edad, es decir cuando se ha iniciado la acumulación de tau insoluble pero aún no se manifiestan la mayoría de los déficits cognitivos ni fisiológicos asociados a la PFC en el modelo (Figura 22A). Luego de la inyección, se realizaron ensayos para evaluar el rescate fenotípico a los 12 meses. Se eligió esta edad para los experimentos de punto final ya que, como se ha descripto en trabajos anteriores (Polydoro et al., 2009; Espíndola et al., 2018) y replicado en los experimentos de caracterización de esta tesis, los ratones htau a los 12 meses presentan una marcada patología asociada a la acumulación de tau en la corteza. Previamente a la inyección, se realizó la batería de ensayos comportamentales utilizada en la caracterización del modelo htau para confirmar la presencia de los fenotipos habitualmente observados a los 3 meses de edad, descriptos en la sección 2. Como se puede observar en la figura 22B-E, los ratones htau presentaron hiperlocomoción y desinhibición, sin evidenciar déficits cognitivos a esta edad temprana.

Para analizar el efecto de la reducción de tau, a los 12 meses de edad se realizaron experimentos *in vivo* incluyendo: ensayos comportamentales, análisis de la captación de 18F-FDG por microPET y registros electrofisiológicos de campo medidos en la PFC. Seguidamente se realizaron análisis *post-mortem* de esta estructura para determinar el contenido de tau insoluble y tau total por Western blot y la cuantificación de cúmulos de tau hiperfosforilada mediante *Array Tomography* e inmunohistoquímica. Para determinar la especificidad de la inyección, además se evaluó el contenido de tau patológica y tau total en estructuras cercanas a la PFC.

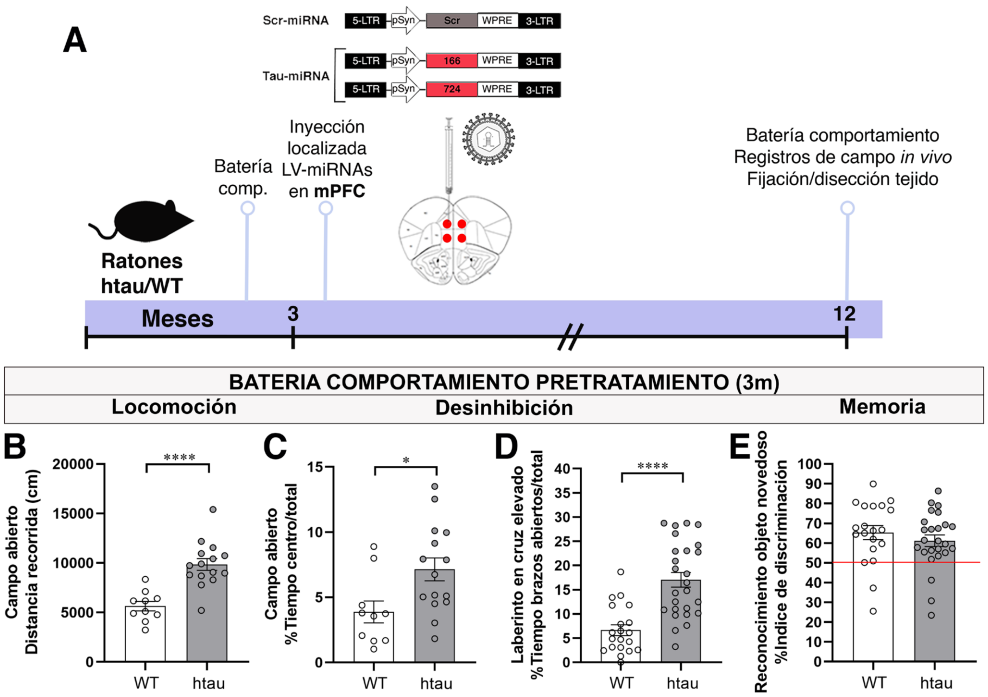



**Figura 22. Tratamiento temprano y sitio-específico con los Tau-miRNAs en la PFC del ratón htau. A.** Esquema de trabajo de las inyecciones sitio-específicas de los amiRNAs empaquetados en partículas lentivirales (LV-miRNAs) en la mPFC realizadas a los 3 meses de edad. Se utilizaron cohortes de ratones htau y WT (machos y hembras) y se les realizó una batería de ensayos de comportamiento de forma previa a la inyección. Luego de las inyecciones se esperaron los ratones hasta los 12 meses de edad para llevar a cabo los experimentos *in vivo* y la recolección del tejido para ensayos *post-mortem*. **B-E.** Batería de ensayos de comportamiento realizada de forma previa al tratamiento con los LV-miRNAs, a los 3 meses de edad. **B-C.** Distancia recorrida (**B**) y porcentaje de tiempo en el centro (**C**) en el ensayo de campo abierto. **D.** Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos en el laberinto en cruz elevado. **E.** Índice de discriminación en el ensayo de reconocimiento de objeto novedoso. Campo abierto: WT=10, htau=15; laberinto en cruz elevado y reconocimiento de objeto novedoso: WT=20, htau=25. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; *t-test* paramétrico. **p*<0,05, *****p*<0,0001.

## Evaluación de los fenotipos conductuales, metabólicos y electrofisiológicos del ratón htau por el tratamiento temprano con los Tau-miRNAs en la corteza prefrontal

Para medir el rescate fenotípico a los 12 meses de edad en los ratones htau tratados con los Tau-miRNAs, se empleó inicialmente la misma batería de ensayos de comportamiento utilizada para la caracterización del modelo. Se pudo observar en los resultados obtenidos para el ensayo de NOR que el grupo htau Scr-miRNA presentó un índice de discriminación promedio de alrededor del 50%, mientras que la inyección en la PFC con los Tau-miRNAs previno el desarrollo de este déficit cognitivo en los ratones htau, alcanzando niveles similares al grupo WT (Figura 23A-B). Asimismo, los tiempos de exploración totales no presentaron diferencias significativas entre los grupos analizados (Figura 23C).

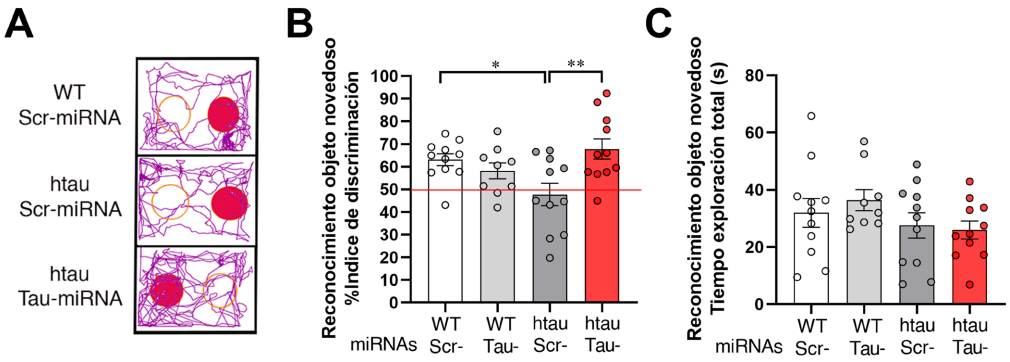



**Figura 23. El tratamiento temprano y sitio-específico con los Tau-miRNAs previene el déficit cognitivo en el ensayo de NOR en ratones htau. A-C.** Ensayo de NOR para los ratones de 12 meses de edad tratados de forma preventiva con los Tau-miRNAs. **A.** Ejemplos de trayectorias realizadas (en violeta) para cada grupo. Los círculos en rojo indican la posición del objeto novedoso y los círculos vacíos representan el objeto familiar. Los gráficos muestran el índice de discriminación (**B**) y el tiempo de exploración total (**C**). WT Scr-miRNA=11, WT Tau-miRNA=9, htau Scr-miRNA=11, htau Tau-miRNA=11. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. *$p$<0,05, **$p$<0,01.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en los fenotipos de desinhibición comportamental, tanto en el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos en el laberinto en cruz elevado (Figura 24A-B), así como para el porcentaje de tiempo en el centro en el ensayo de campo abierto (Figura 24C-D). Para la distancia total recorrida, se observó hiperlocomoción en el ratón htau control como se había descripto en la caracterización (Figura 24C y E), sin embargo, la inyección en la PFC con los Tau-miRNAs no generó cambios en este fenotipo, lo que sugiere que este podría encontrarse asociado además a disfunciones en otras estructuras del cerebro del modelo en estudio. Finalmente, cabe destacar que el comportamiento de los ratones WT frente al tratamiento de los Tau-miRNAs no fue modificado en ninguno de los ensayos realizados, presentando valores similares al grupo WT Scr-miRNA.

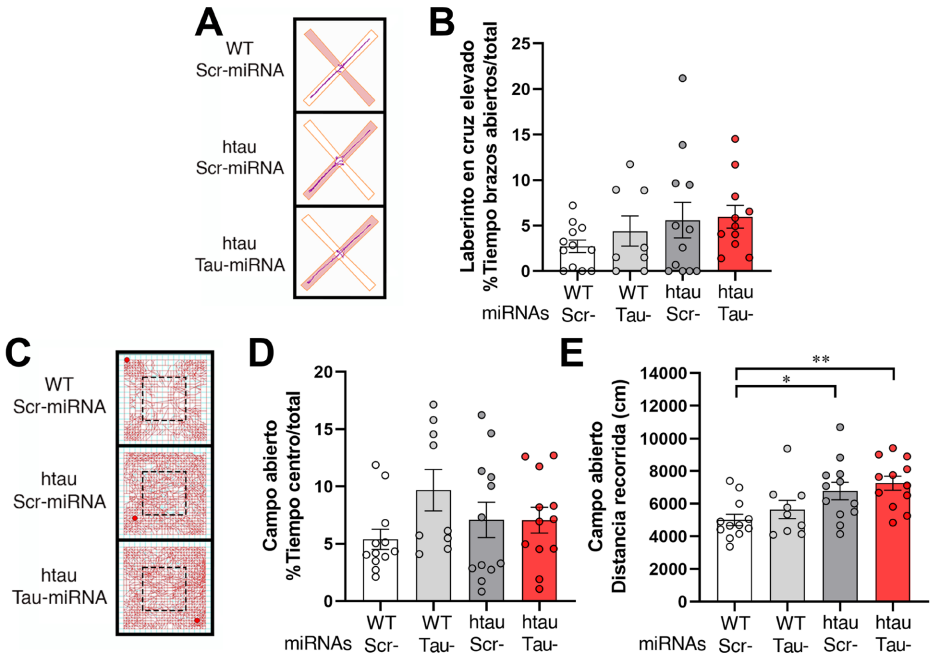



**Figura 24. Evaluación del tratamiento temprano y sitio-específico de los Tau-miRNAs en fenotipos de desinhibición y locomoción en ratones htau. A-B.** Laberinto en cruz elevado para los ratones de 12 meses de edad tratados de forma preventiva con los Tau-miRNAs. **A.** Ejemplos de trayectorias realizadas (en violeta) por cada grupo. Los brazos abiertos están marcados en color. **B.** Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos. WT Scr-miRNA=12, WT Tau-miRNA=8, htau Scr-miRNA=12, htau Tau-miRNA=11. **C-E.** Ensayo de campo abierto. **C.** Trayectorias representativas para cada grupo. Los cuadrados punteados en negro determinan el centro de la arena. Porcentaje de tiempo en el centro (**D**) y distancia total recorrida (**E**). WT Scr-miRNA=12, WT Tau-miRNA=9, htau Scr-miRNA=12, htau Tau-miRNA=12. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. **p*<0,05, ***p*<0,01.

Luego del análisis conductual se realizó el ensayo de captación de 18F-FDG por microPET, para el cual se compararon los animales inyectados medidos a los 12 meses de edad y los animales de 6 meses utilizados para la caracterización (Figura 25). Esto se realizó con el fin de estudiar de forma indirecta los cambios en el metabolismo de glucosa en la corteza prelímbica (círculos punteados en rojo), región donde se dirigió la inyección de los Tau-miRNAs. Se puede observar que mientras el grupo htau Scr-miRNA presentó una disminución en la captación de 18F-FDG a lo largo de la edad en esta región, el tratamiento con los Tau-miRNAs en los ratones htau previno esta reducción, sin mostrar diferencias significativas entre las edades analizadas, al igual que lo observado para el grupo WT control. Sin embargo, es necesario remarcar que, así como el grupo htau Tau-miRNA no presentó cambios en la captación de 18F-FDG en la región inyectada, otras áreas cercanas a la misma como la corteza motora y la corteza somatosensorial manifestaron menor captación de este análogo de glucosa a lo largo de la edad (incluso siendo más significativa que en el grupo htau control), mientras que otras estructuras como la corteza piriforme presentaron cierto rescate.

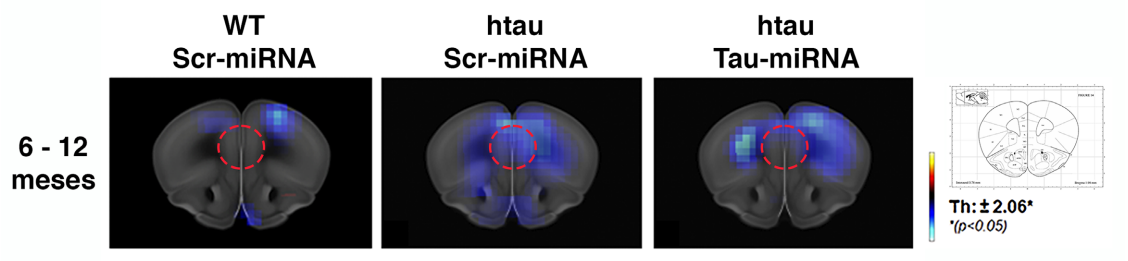



**Figura 26. El tratamiento temprano y sitio-específico de los Tau-miRNAs previene la disminución en la captación de 18F-FDG en la corteza prelímbica del ratón htau.** Secciones coronales que muestran los cambios en la captación de 18F-FDG en la PFC al comparar ratones de 12 meses tratados con los amiRNAs contra los ratones caracterizados a los 6 meses por microPET. 6 meses n: WT=11, htau=9. Tratados 12 meses n: WT Scr-miRNA=6, htau Scr-miRNA=6, htau Tau-miRNA=8. Las imágenes muestran los resultados como una comparación estadística del análisis de *t-test*. Los cambios significativos (*$p$<0,05) se representan con colores, utilizando la escala colorimétrica de la derecha. La escala del rojo al amarillo representa incrementos en la captación de 18F-FDG, mientras que el azul a celeste representa disminuciones en la captación de 18F-FDG.

Seguidamente, los animales fueron analizados en los registros electrofisiológicos de campo *in vivo* en la PFC. Tal como fue descripto en la caracterización del modelo (sección 2), se discriminaron las neuronas piramidales de las interneuronas según la forma promedio de los disparos obtenida para cada neurona registrada (Figura 26A y Ver Materiales y Métodos). En el caso de las neuronas piramidales, se puede observar que la tasa de disparos fue significativamente mayor para el grupo htau control en comparación con el grupo WT, tal como se había descripto previamente para los 12 meses de edad (Figura 26B). Sin embargo, el tratamiento de los Tau-miRNAs en el grupo htau disminuyó de forma significativa la tasa de disparos de las neuronas piramidales, logrando niveles similares al control WT. Asimismo, al analizar las frecuencias acumuladas para la tasa de disparos de las neuronas piramidales se puede ver una distribución similar entre el grupo htau Tau-miRNA y el grupo WT control, mientras que los ratones htau Scr-miRNA presentaron una distribución diferente (Figura 26C). Para la tasa de disparos de las interneuronas, no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados (Figura 26D).

Para complementar este análisis, se procedió a evaluar la distribución de los disparos de las neuronas piramidales. La representación en escala logarítmica de los intervalos entre disparos consecutivos (ISIs, por *Interspike Intervals* en inglés), permitió denotar que todos los grupos tratados presentan neuronas que disparan en forma de ráfagas (o *bursts* en inglés), por la presencia de un pico alrededor de los 10ms y una distribución de tipo bimodal (Figura 27A-C). Para lograr una medida cuantitativa de la distribución de estos disparos para las neuronas piramidales de cada grupo, se calculó el índice de actividad en ráfagas o *burstiness index* (Ver Materiales y métodos). El grupo htau Scr-miRNA presentó una actividad en forma de ráfagas significativamente mayor

al grupo WT Scr-miRNA en la PFC (Figura 27D), mientras que los ratones htau tratados con los Tau-miRNAs presentaron una disminución en el índice de actividad en ráfagas, alcanzando valores similares al grupo WT control.

En conjunto, los resultados obtenidos al evaluar el tratamiento temprano *in vivo* en el ratón htau, permiten concluir que la administración de los Tau-miRNAs en la PFC de forma previa a la aparición de fenotipos patológicos, previene el desarrollo del déficit cognitivo en el ensayo de NOR, y concomitantemente, evita la disminución en la captación de 18F-FDG con el envejecimiento y modula la actividad de las neuronas piramidales en la región inyectada.

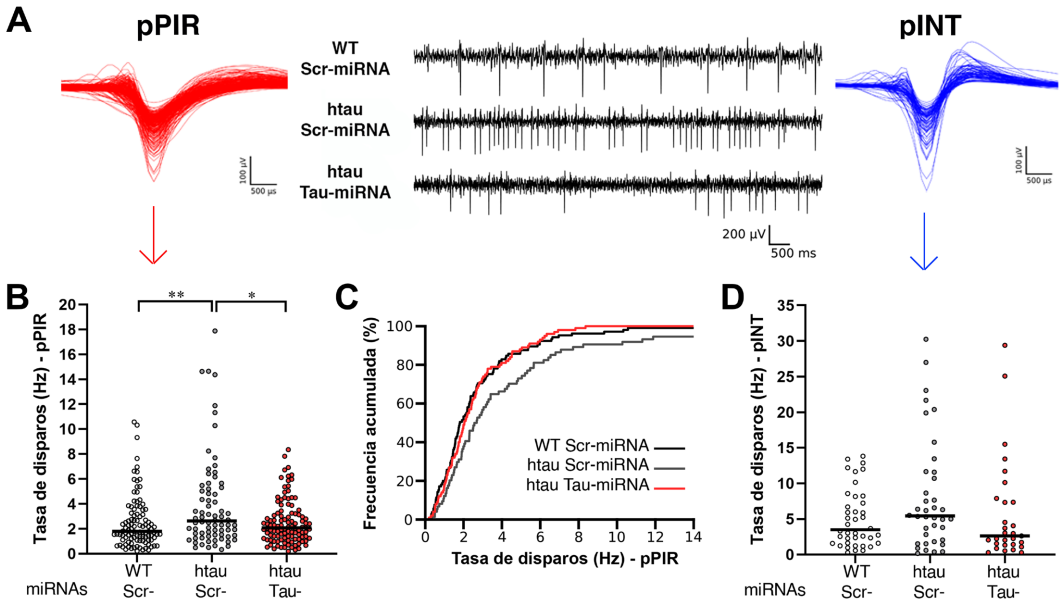



**Figura 26. El tratamiento temprano y sitio-específico de los Tau-miRNAs disminuye la tasa de disparos de las neuronas piramidales en la PFC del ratón htau. A.** Trazas representativas de una señal electrofisiológica filtrada entre 300 y 6000 Hz para cada grupo tratado con los amiRNAs. A partir de estos registros se clasificaron las neuronas según la forma promedio del disparo en dos grupos, correspondiendo a las neuronas putativas piramidales (pPIR, en rojo) e interneuronas putativas (pINT, en azul). Ratones n: WT Scr-miRNA=4, htau Scr-miRNA=5, htau Tau-miRNA=7. **B.** Tasa de disparos para las pPIR. Neuronas n: WT Scr-miRNA=104, htau Scr-miRNA=74, htau Tau-miRNA=110. **C.** Gráfico de frecuencia acumulada para la tasa de disparos de las pPIR. **D.** Tasa de disparos para las pINT. Neuronas n: WT Scr-miRNA=40, htau Scr-miRNA=38, htau Tau-miRNA=29. Para los gráficos B y D, cada punto representa el promedio de la tasa de disparos para cada neurona registrada a lo largo de la sesión. Las líneas negras representan la mediana para cada grupo. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn. Para el gráfico C, prueba de Kolmogórov-Smirnov para frecuencias acumuladas. *$p$<0,05, **$p$<0,01.

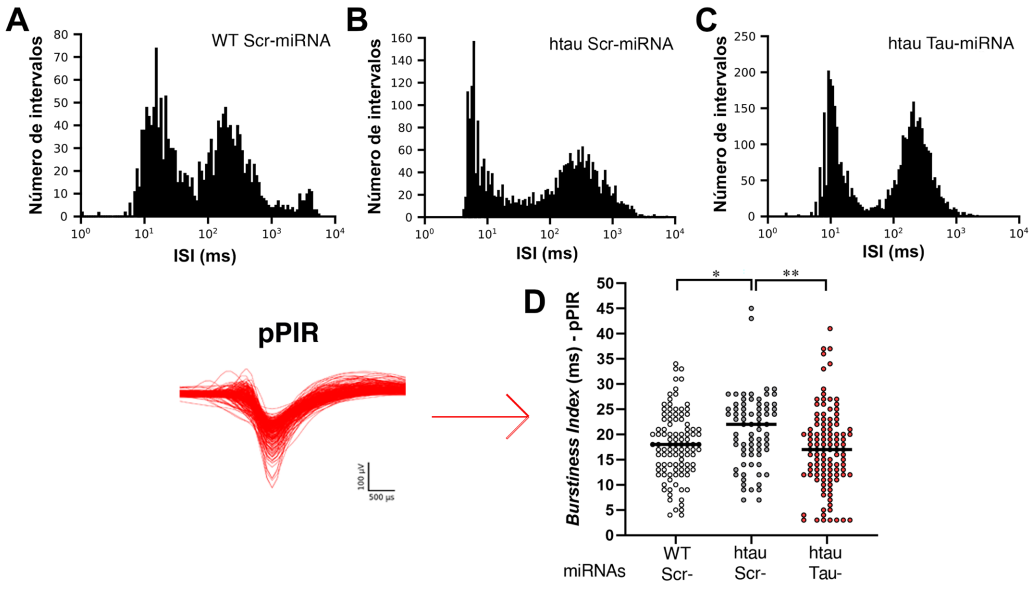



**Figura 27. La distribución de los disparos de las neuronas piramidales en la PFC del ratón htau es modulada por el tratamiento temprano y sitio-específico con los Tau-miRNAs. A-C.** Histogramas de intervalos entre disparos (ISIs, *en inglés*) para una neurona representativa de cada grupo tratado (en escala logarítmica). El agrupamiento de los ISIs en dos picos, para el cual uno de ellos se encuentra cercano a los 10 ms, indica que los disparos ocurrieron en forma de ráfagas en estas neuronas. **D.** Índice de actividad en ráfagas o *burstiness index* (BI) de las neuronas pPIR para cada grupo tratado. Cada punto representa el promedio del BI para cada neurona registrada a lo largo de la sesión. Las líneas negras representan la mediana para cada grupo. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn. *$p$<0,05, **$p$<0,01.

## Análisis del efecto del tratamiento temprano con los Tau-miRNAs sobre la acumulación patológica de tau en la corteza prefrontal del ratón htau

Seguidamente se analizó si existe una correlación entre los cambios fenotípicos observados en los ratones htau tratados con los Tau-miRNAs y los cambios en la acumulación o niveles de tau patológica. En este contexto, por tau patológica se refiere a las formas de tau hiperfosforilada y/o insoluble que se acumulan en las regiones cerebrales afectadas. Por una parte, se utilizó una estrategia experimental que permite visualizar los cúmulos de tau hiperfosforilada (p-tau), mediante la técnica de *Array Tomography* seguida de inmunohistoquímica. Esta técnica de alta resolución permite realizar una cuantificación de los botones sinápticos a partir de cortes ultrafinos de cerebro. Su aplicación ha permitido estudiar el rol de tau patológica en las sinapsis en un modelo murino de taupatía (Kopeikina et al., 2013) y en pacientes con EA (Colom-Cadena et al., 2023), a través de la colocalización de marcadores de tau patológica con marcadores del compartimento pre y postsináptico. Además, la técnica de *Array Tomograpy* permite cuantificar cúmulos de tau patológica, mientras que las técnicas de inmunohistoquímica convencionales no brindan el mismo nivel de resolución. Este ensayo fue realizado en el laboratorio del Dr. Mariano Soiza-Reilly, tomando como referencia los trabajos mencionados anteriormente. De este modo, se analizó la PFC de

los ratones inyectados (Figura 28A) mediante la marcación de p-tau (AT180, en verde) junto con un marcador presináptico, sinapsina 1a (en magenta).

El análisis cuantitativo en ratones de 12 meses de edad indicó que el grupo htau Scr-miRNA presenta una mayor densidad de cúmulos de p-tau en la PFC comparado con el grupo WT, mientras que el tratamiento con los Tau-miRNAs disminuyó de forma significativa la acumulación patológica de tau (Figura 28A-B). Asimismo, al medir la colocalización de los cúmulos de p-tau con sinapsina, se observó que la inyección de los Tau-miRNAs en los ratones htau redujo los niveles de p-tau presentes en los botones sinápticos de la PFC (Figura 28A y C). Como control de este experimento, no se observaron diferencias en los niveles del marcador sinapsina para los distintos grupos (Figura 28D), indicando que el número de botones sinápticos no varía entre tratamientos.

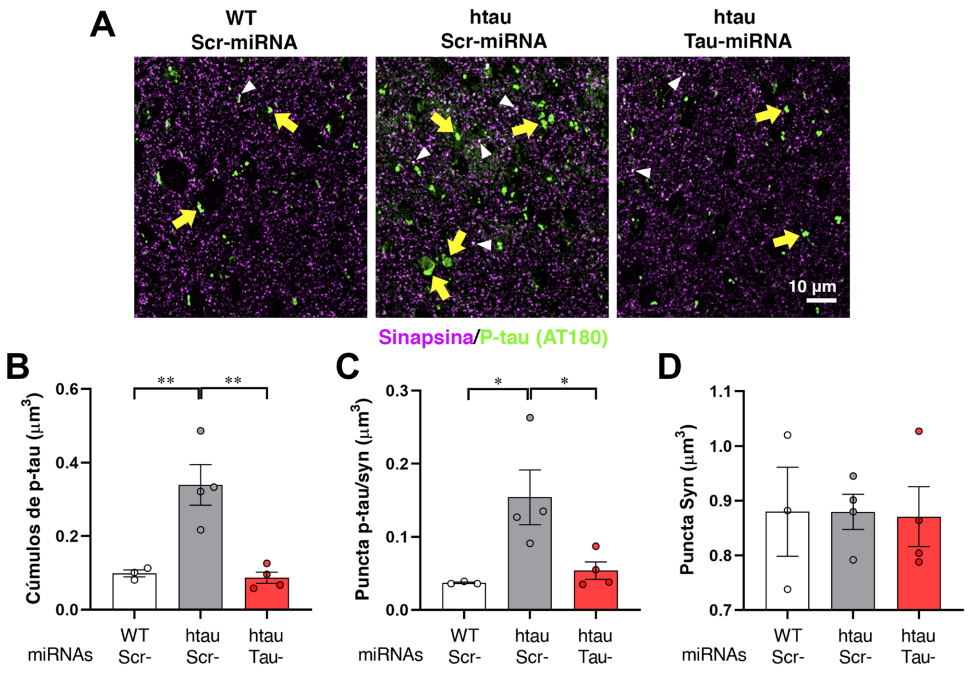



**Figura 28. El tratamiento temprano y sitio-dirigido con los Tau-miRNAs reduce los niveles de acumulación de p-tau en los botones sinápticos de la PFC de los ratones htau. A.** Imágenes representativas obtenidas por *Array Tomography* mostrando la marcación de tau fosforilada en la treonina 231 (AT180, en verde) en los neuropilos sinápticos de la PFC de los ratones tratados con los amiRNAs. La acumulación de p-tau se marca con las flechas amarillas. Las flechas blancas indican la colocalización de AT180 con el marcador presináptico sinapsina 1a (en magenta). **B-D.** Análisis cuantitativo en la PFC de la densidad de: cúmulos de AT180 (**B**), botones sinápticos de p-tau/sinapsina (**C**) y botones sinápticos totales (**D**). WT Scr-miRNA n=3, htau Scr-miRNA n=4, htau Tau-miRNA n=4. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. **p*<0,05, ***p*<0,01.

Con el fin de determinar si estos cambios eran específicos de la región inyectada, se analizaron los mismos parámetros en una estructura no inyectada, particularmente la corteza insular agranular (AI, por sus siglas en inglés), región ubicada en las proximidades de la corteza prelímbica. Efectivamente, no se observaron cambios en el número de cúmulos de p-tau ni en su colocalización con los botones sinápticos en los ratones htau tratados con los Tau-miRNAs (Figura 29), confirmando que el mecanismo de acción utilizado se encuentra restringido únicamente a la región inyectada, la PFC.

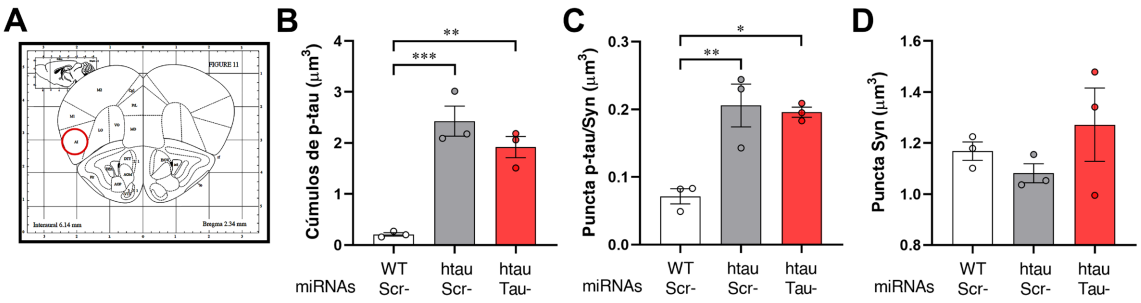



**Figura 29. El tratamiento sitio-específico con los Tau-miRNAs en la PFC de forma temprana no afecta la acumulación de p-tau en los botones sinápticos de la AI. A.** Imagen de corte coronal AP=+2,3, coordenada donde se realizó la inyección de los LVs con los amiRNAs en la PFC. El círculo rojo marca la corteza insular agranular (AI), región cercana al sitio de inyección. **B-D.** Análisis cuantitativo de *Array Tomography* en la AI de los ratones tratados con los amiRNAs, mostrando la densidad de: cúmulos de AT180 (**B**), botones sinápticos de p-tau/sinapsina (**C**) y botones sinápticos totales (**D**). WT Scr-miRNA n=3, htau Scr-miRNA n=3, htau Tau-miRNA n=3. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001.

Paralelamente, se realizaron ensayos de detección de tau patológica mediante Western blot. Para esto se prepararon homogenatos de la PFC de ratones inyectados, en los cuales se midieron los niveles de tau total y tau insoluble, siendo esta última obtenida a partir del fraccionamiento de sarkosyl (Figura 30A-B). Como se ha descripto en la sección anterior, los ratones htau presentaron acumulación de tau insoluble en la PFC desde los 3 meses, tal como se observa en este experimento en el grupo htau control a los 12 meses de edad (Figura 30A-B). No obstante, la inyección localizada de los Tau-miRNAs redujo de forma significativa el contenido de tau insoluble en los ratones htau. Resultados similares se obtuvieron al medir los niveles de tau total, donde se observó una reducción de alrededor del 30% en los ratones htau tratados con los Tau-miRNAs en comparación con el grupo htau control (Figura 30C-D). Para confirmar que esta disminución fuera específica de la región inyectada, se analizó el contenido de tau total en otra área cercana a la PFC, en este caso la corteza motora 1 (M1, Figura 31A). No se observaron diferencias significativas en los niveles de tau total en esta región entre los ratones htau Scr-miRNA o htau Tau-miRNA (Figura 31B-C).

El conjunto de estos ensayos inmunoquímicos y bioquímicos *post-mortem* sugiere que el tratamiento con microARNs artificiales dirigidos contra el ARN mensajero de *MAPT* produce el silenciamiento de tau de forma sitio-específica. Si bien el nivel de reducción de tau total en la PFC del modelo htau fue de alrededor del 30%, este ha sido suficiente para disminuir su acumulación patológica en formas insolubles o hiperfosofriladas.

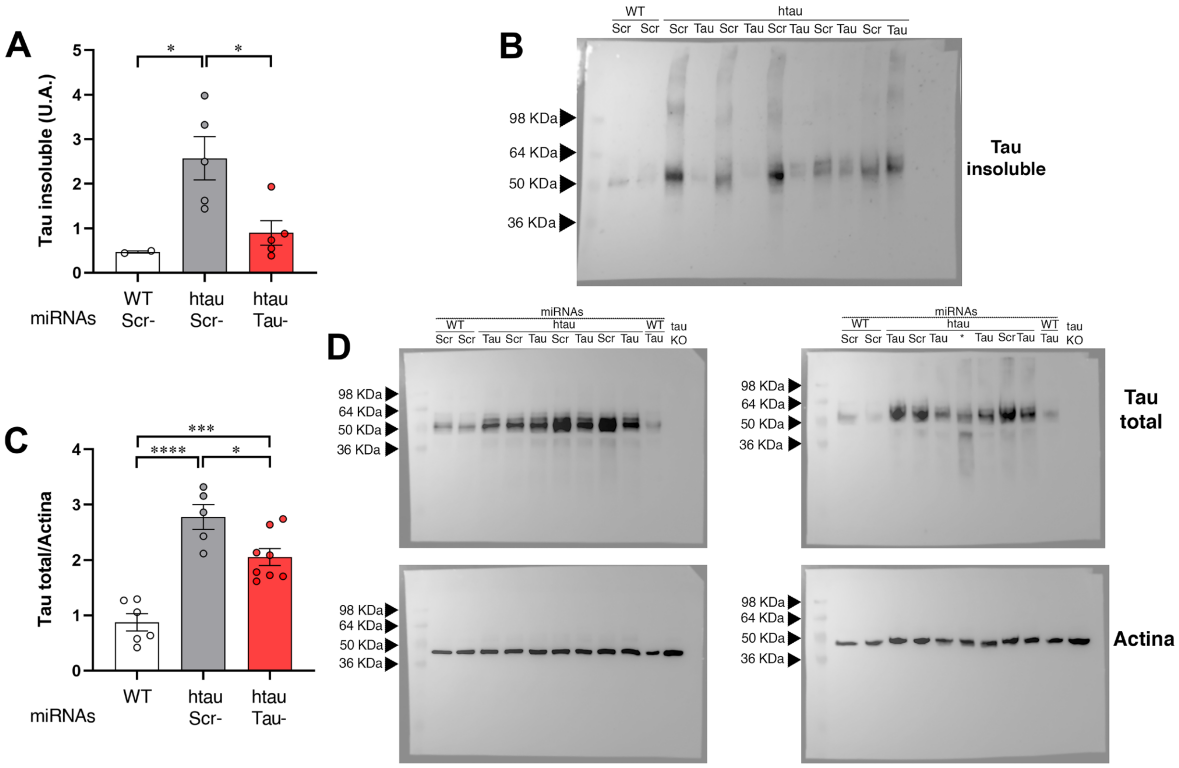



**Figura 30. El tratamiento temprano de los Tau-miRNAs de forma sitio-específica en los ratones htau disminuye los niveles de tau insoluble y total en la PFC. A-B.** Niveles de tau insoluble fraccionada por el reactivo de sarkosyl en la PFC de ratones de 12 meses tratados con los amiRNAs. **A.** Cuantificación del contenido de tau insoluble a partir de las membranas utilizadas en Western blot **(B)**. WT Scr-miRNA=2, htau Scr-miRNA=5, htau Tau-miRNA=5. **C-D.** Niveles de tau total. **C.** Cuantificación del contenido de tau total a partir de las membranas de Western blot **(D)**, utilizando actina como control de carga. tauKO: control negativo para la marcación de tau. *: o*utliers* no incluidos en el análisis. WT=6, htau Scr-miRNA=5, htau Tau-miRNA=8. El grupo WT incluye muestras del grupo WT Scr-miRNA y WT Tau-miRNA, ya que se obtuvieron valores similares para los niveles de tau total entre estos grupos. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. *$p$<0,05, ***$p$<0,001, ****$p$<0,0001.

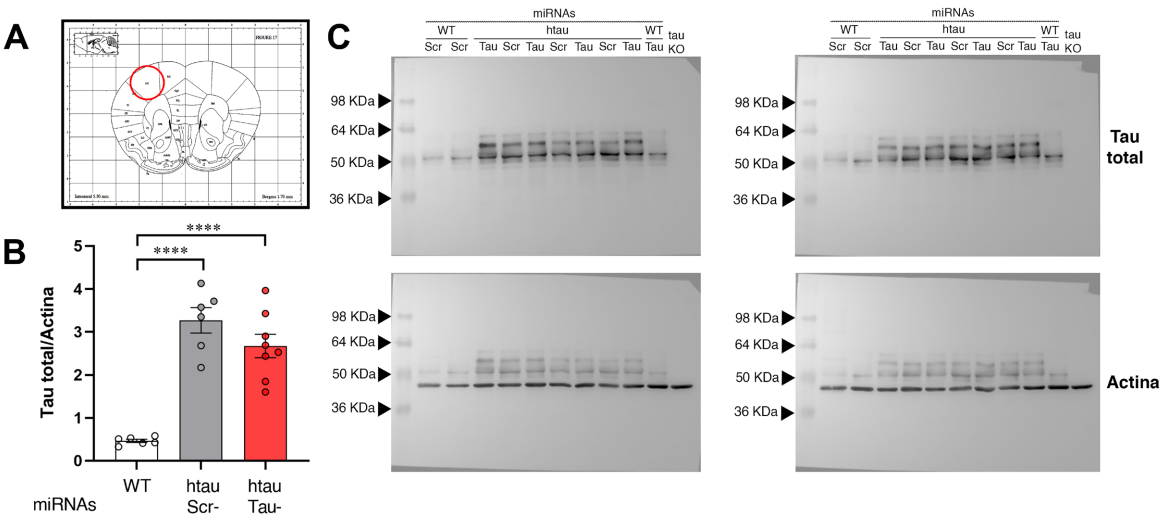



**Figura 31. El tratamiento sitio-específico con los Tau-miRNAs en la PFC de forma temprana no afecta los niveles de tau total en la M1 de los ratones htau. A.** Imagen de corte coronal AP=+1,7, coordenada cercana al sitio de inyección de los LVs con los amiRNAs. El círculo rojo marca la corteza motora 1 (M1), estructura cercana a la PFC. **B-C.** Niveles de tau total en la M1 de ratones de 12 meses tratados con los amiRNAs. **B.** Cuantificación del contenido de tau total a partir de las membranas de Western blot **(C)**, utilizando actina como control de carga. tauKO: control negativo para la marcación de tau. WT=6, htau Scr-miRNA=6, htau Tau-miRNA=8. El grupo WT incluye muestras del grupo WT Scr-miRNA y WT Tau-miRNA, ya que se obtuvieron valores similares para los niveles de tau total entre estos grupos. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. ****$p$<0,0001.

En conjunto, los resultados de esta subsección indican que la reducción localizada de tau patológica en la PFC mediante el tratamiento temprano con los Tau-miRNAs previene los fenotipos comportamentales y fisiológicos característicos del modelo htau envejecido. Esta evidencia ha constituido una prueba de concepto para evaluar el silenciamiento de tau durante una fase sintomática temprana en los ratones htau, aspecto que se abordará en el apartado siguiente.

## 3.B. Rescate fenotípico en el ratón htau a través del tratamiento sitio-específico con los Tau-miRNAs

Frente a los resultados obtenidos como prueba de concepto mediante el tratamiento con los Tau-miRNAs de forma previa a la aparición de fenotipos patológicos en el ratón htau, el siguiente objetivo consistió en realizar un rescate funcional mediante la inyección posterior a la manifestación del *onset* fenotípico en el modelo. Para esto, se realizaron inyecciones estereotáxicas de los Tau-miRNAs en la PFC de ratones htau y WT a los 6 meses (Figura 32A), edad de aparición de los fenotipos asociados a taupatía en el modelo htau a partir de la caracterización de su curso temporal. De forma previa a la inyección, se realizó la batería de ensayos de comportamiento para determinar que efectivamente las cohortes de ratones htau presentasen los fenotipos a los 6 meses de edad que fueron descriptos en la sección 2. Como se muestra en la figura 32B-E, los ratones htau presentaron hiperlocomoción, desinhibición y déficit cognitivo en el ensayo de NOR con respecto al grupo WT. Cabe destacar que, si bien en el ensayo de laberinto en cruz elevado la diferencia entre grupos no fue significativa, se puede observar una tendencia a un mayor porcentaje de tiempo en los brazos abiertos para los ratones htau.

En este caso, el tratamiento con los amiRNAs se realizó inmediatamente después de estos ensayos comportamentales. Los ratones inyectados fueron analizados en los ensayos *in vivo* a los 12 meses de edad (6 meses postratamiento) seguidos por la evaluación *post-mortem*, con el fin de determinar el rescate fenotípico mediante los Tau-miRNAs y su efecto sobre la acumulación de tau patológica.

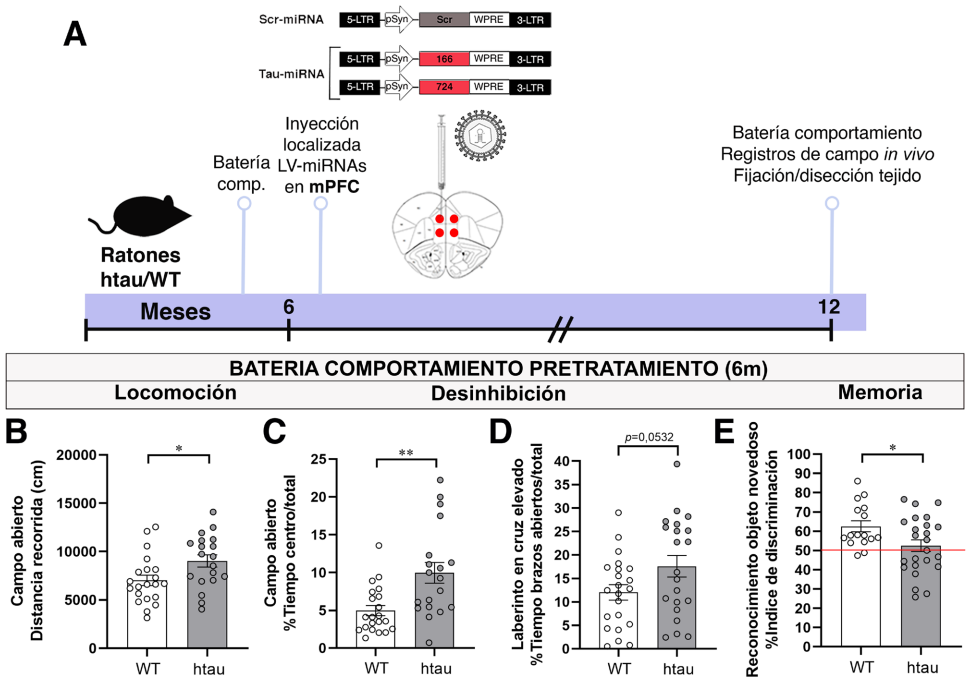



**Figura 32. Rescate tardío con el tratamiento sitio-específico de los Tau-miRNAs en la PFC del ratón htau. A.** Esquema de trabajo de las inyecciones sitio-específicas de los amiRNAs empaquetados en partículas lentivirales (LV-miRNAs) en la mPFC realizadas a los 6 meses de edad, momento a partir del cual aparecen los fenotipos patológicos en el modelo htau. Se utilizaron cohortes de ratones htau y WT (machos y hembras) y se les realizó una batería de ensayos de comportamiento de forma previa a la inyección. Luego de las inyecciones se esperaron los ratones hasta los 12 meses de edad para llevar a cabo los experimentos *in vivo* y la recolección del tejido para ensayos *post-mortem*. **B-E.** Batería de ensayos de comportamiento realizada de forma previa al tratamiento con los LV-miRNAs, a los 6 meses de edad. **B-C.** Distancia recorrida (**B**) y porcentaje de tiempo en el centro (**C**) en el ensayo de campo abierto. **D.** Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos en el laberinto en cruz elevado. **E.** Índice de discriminación en el ensayo de reconocimiento de objeto novedoso. Campo abierto: WT=21, htau=19; laberinto en cruz elevado: WT=22, htau=21; reconocimiento de objeto novedoso: WT=16, htau=24. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; *t-test* paramétrico. **p*<0,05, ***p*<0,01.

## Evaluación del rescate fenotípico conductual y electrofisiológico en el ratón htau luego del tratamiento tardío con los Tau-miRNAs en la corteza prefrontal

En el ensayo de NOR, realizado a los 12 meses de edad, se observó un rescate significativo en el índice de discriminación del grupo htau tratado con los Tau-miRNAs, el cual aumentó de forma significativa en comparación con el grupo htau control, alcanzando valores similares al grupo WT (Figura 33A-B). Además, para evaluar el efecto del tratamiento en cada individuo, se compararon el índice de discriminación inicial (pretratamiento, a los 6 meses de edad) y después del tratamiento (12 meses de edad). En este caso, se puede observar que en todos los ratones del grupo htau Tau-miRNA el índice de discriminación del objeto novedoso aumentó significativamente luego del tratamiento, mientras que en los ratones del grupo htau Scr-miRNA se mantuvieron los índices de discriminación iniciales, cercanos al 50% (Figura 33C). Cabe

aclarar que para esta última comparación se analizaron únicamente dos cohortes de ratones tratados. Como control del ensayo, se muestra que los tiempos de exploración no variaron entre los grupos analizados a los 12 meses, ni tampoco al comparar los animales antes y después del tratamiento (Figura 33D-E).

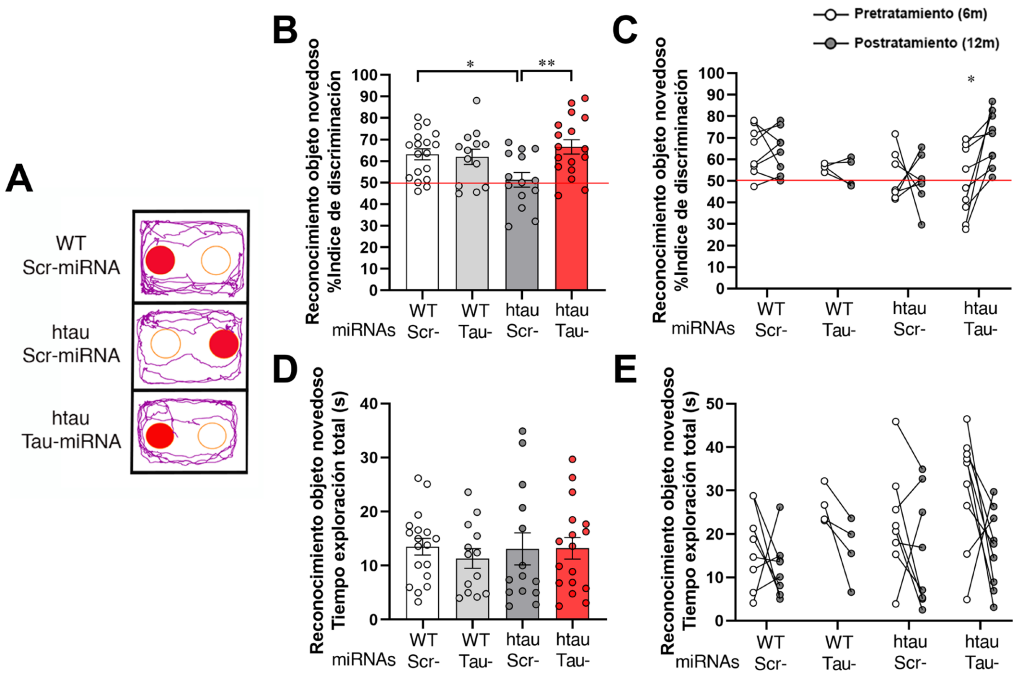



**Figura 33. El tratamiento tardío de los Tau-miRNAs en la PFC de los ratones htau rescata el déficit cognitivo en el ensayo de NOR. A.** Ejemplos de trayectorias realizadas (en violeta) por cada grupo analizado a los 12 meses de edad. Los círculos en rojo indican el objeto novedoso y los círculos vacíos representan el objeto familiar. Índice de discriminación (**B**) para los distintos grupos tratados analizados a los 12 meses y (**C**) para cada grupo comparando cada animal antes (Pretratamiento 6m) y después del tratamiento (Postratamiento 12m). Tiempo de exploración total (**D**) para los distintos grupos tratados analizados a los 12 meses y (**E**) para cada grupo comparando cada animal antes y después del tratamiento. Para los gráficos B y D: WT Scr-miRNA=18, WT Tau-miRNA=13, htau Scr-miRNA=14, htau Tau-miRNA=17. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. Para los gráficos C y E: WT Scr-miRNA=8, WT Tau-miRNA=4, htau Scr-miRNA=7, htau Tau-miRNA=9. Datos representados como puntos de dispersión; *t*-test pareado. **p*<0,05, ***p*<0,01.

A fin de determinar posibles diferencias ligadas al sexo, se analizó el índice de discriminación comparando machos y hembras para cada grupo, para los cuales no se observaron diferencias significativas (Figura 34). Esto indica que el tratamiento con los Tau-miRNAs produce una mejoría en el ensayo de NOR de forma similar entre ambos sexos.

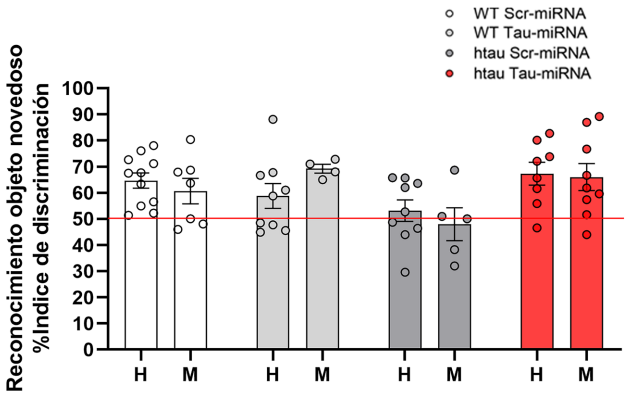



**Figura 34. El rescate cognitivo en el ensayo de NOR por el tratamiento de los Tau-miRNAs es similar entre sexos.** Índice de discriminación para hembras (H) y machos (M) de cada grupo tratado. WT Scr-miRNA: H=11, M=7; WT Tau-miRNA: H=9, M=4; htau Scr-miRNA: H=9, M=5; htau Tau-miRNA: H=8, M=9. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; *t*-test paramétrico.

Para el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos en el ensayo de laberinto en cruz elevado, no se observaron diferencias entre los grupos analizados en el rescate fenotípico (Figura 35A-B). Esto podría deberse a la atenuación en los fenotipos de desinhibición que ocurre habitualmente entre los 6 y 12 meses de edad en el ratón htau, presentando valores similares al grupo WT. Tal como se describió en la caracterización del modelo en la sección 2, se observó una disminución en el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos entre los grupos htau (Scr-miRNA o Tau-miRNA) antes y después del tratamiento, aunque esta comparación no ha sido estadísticamente significativa (Figura 35C). Consistentemente, en el ensayo de campo abierto se obtuvieron resultados similares para el porcentaje de tiempo en el centro (Figura 35D-E), aunque se observó una reducción de este fenotipo más consistente entre los 6 y 12 meses de edad, la cual ha sido significativa para todos los grupos tratados (Figura 35F). Al igual que para el tratamiento preventivo, el grupo htau Scr-miRNA presentó hiperlocomoción en el campo abierto a los 12 meses respecto al grupo WT (Figura 35D y G-H). Si bien en el grupo htau Tau-miRNA se observa una disminución en la actividad locomotora, esta diferencia no resultó significativa en comparación al grupo htau control, ni entre la condición pre y postratamiento.

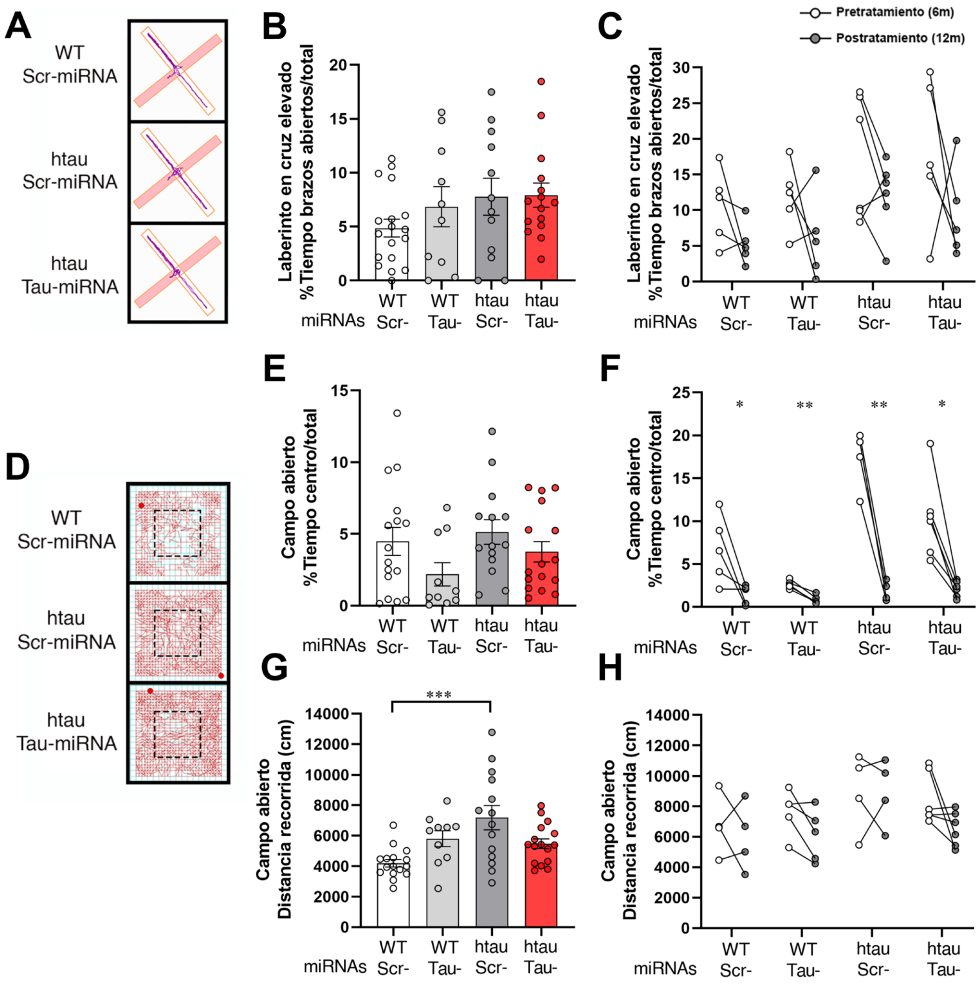



**Figura 35. El tratamiento tardío de los Tau-miRNAs en la PFC de los ratones htau no produce cambios en la desinhibición o en la hiperactividad de ratones htau envejecidos. A.** Ejemplos de trayectorias realizadas (en violeta) por cada grupo analizado a los 12 meses de edad en el ensayo de laberinto en cruz elevado. Los brazos abiertos están marcados en color. Porcentaje en los brazos abiertos (**B**) para los distintos grupos tratados y analizados a los 12 meses y (**C**) comparación del porcentaje en los brazos abiertos por cada animal antes (Pretratamiento 6m) y después del tratamiento con amiRNAs (Postratamiento 12m). **D.** Ejemplos de trayectorias realizadas (en rojo) por cada grupo analizado a los 12 meses de edad en el ensayo de campo abierto. Los cuadrados punteados en negro determinan el centro de la arena. Porcentaje de tiempo en el centro (**E**) para los distintos grupos tratados analizados a los 12 meses y (**F**) para cada grupo comparando cada animal antes y después del tratamiento. Distancia recorrida (**G**) para los distintos grupos tratados analizados a los 12 meses y (**H**) para cada grupo comparando cada animal antes y después del tratamiento. Para el gráfico B: WT Scr-miRNA=18, WT Tau-miRNA=10, htau Scr-miRNA=12, htau Tau-miRNA=15 y para los gráficos E y G: WT Scr-miRNA=16, WT Tau-miRNA=10, htau Scr-miRNA=14, htau Tau-miRNA=16. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. Para el gráfico C: WT Scr-miRNA=5, WT Tau-miRNA=5, htau Scr-miRNA=6, htau Tau-miRNA=5 y para los gráficos F y H: WT Scr-miRNA=4/5, WT Tau-miRNA=5, htau Scr-miRNA=4, htau Tau-miRNA=6. Datos representados como puntos de dispersión; *t*-test pareado. **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001.

Se realizaron seguidamente los registros electrofisiológicos de campo en la PFC y su posterior discriminación entre tipos neuronales según la forma promedio del disparo (Figura 36A y Ver Materiales y Métodos). Se observó que el tratamiento tardío de los Tau-miRNAs en el ratón htau disminuyó de forma significativa la tasa de disparos de las neuronas piramidales con respecto al grupo control (Figura 36B-C). Sin embargo, los

valores obtenidos no fueron equivalentes al grupo WT, sugiriendo que el tratamiento de los Tau-miRNAs a los 6 meses de edad no produce un rescate total de los fenotipos electrofisiológicos, a diferencia de lo observado con la inyección presintomática. Notablemente, en este caso, la tasa de disparos de las interneuronas fue significativamente mayor para el grupo htau control, mientras que el tratamiento de los Tau-miRNAs redujo estos valores a niveles similares al grupo WT (Figura 36D-E).

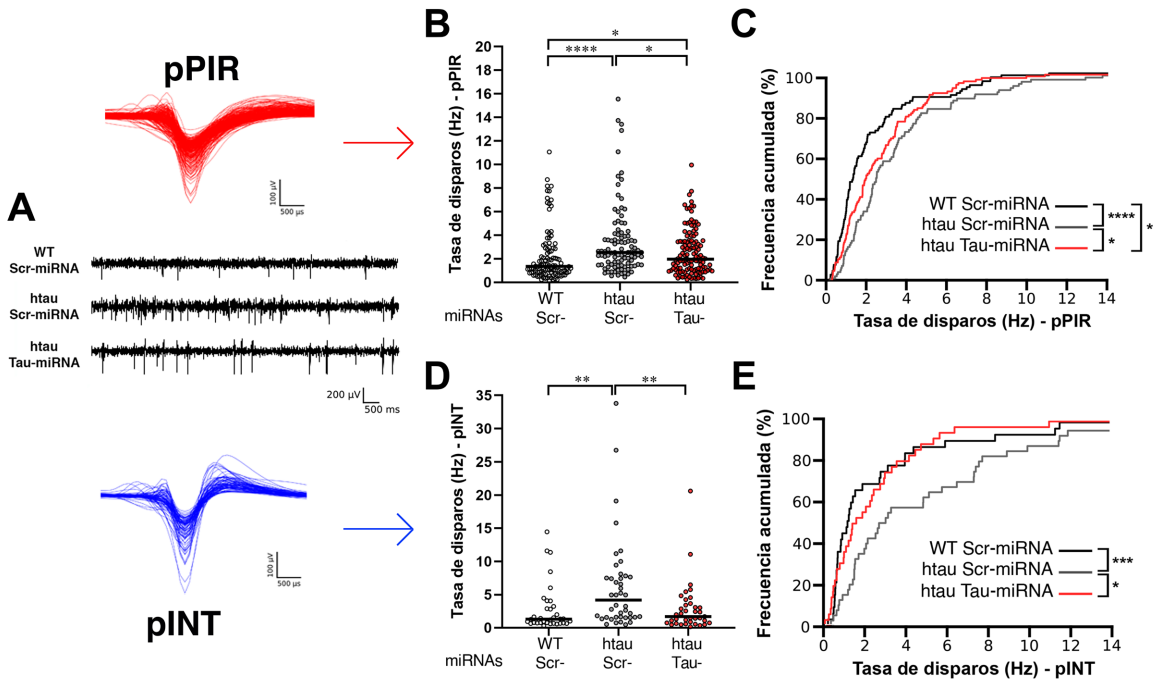



**Figura 36. El tratamiento tardío y sitio-específico de los Tau-miRNAs modula la tasa de disparos de las neuronas de la PFC en los ratones htau. A.** Trazas representativas de una señal electrofisiológica filtrada entre 300 y 6000 Hz para cada grupo tratado con los amiRNAs y su discriminación entre neuronas piramidales putativas (en rojo, pPIR) e interneuronas (en azul, pINT) según la forma del promedio del disparo. Ratones n: WT Scr-miRNA=8, htau Scr-miRNA=8, htau Tau-miRNA=10. **B.** Tasa de disparos para las pPIR. Neuronas n: WT Scr-miRNA=106, htau Scr-miRNA=100, htau Tau-miRNA=123. **C.** Gráfico de frecuencia acumulada para la tasa de disparos de las pPIR. **D.** Tasa de disparos para las pINT. Neuronas n: WT Scr-miRNA=34, htau Scr-miRNA=42, htau Tau-miRNA=37. **E.** Gráfico de frecuencia acumulada para la tasa de disparos de las pINT. Para los gráficos B y D, cada punto representa el promedio de la tasa de disparos para cada neurona registrada a lo largo de la sesión. Las líneas negras representan la mediana para cada grupo. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn. Para los gráficos C y F, prueba de Kolmogórov-Smirnov para frecuencias acumuladas. *$p$<0,05, **$p$<0,01, ***$p$<0,001, ****$p$<0,0001.

Debido a que las tasas de disparos de ambos tipos neuronales fueron moduladas ante el tratamiento con los Tau-miRNAs, se analizó la distribución de los disparos de las neuronas registradas. Los ISIs o *Interspike Intervals* para cada grupo muestran que, como se había observado para el tratamiento temprano, todos los grupos analizados presentan neuronas que disparan en forma de ráfagas o *bursts* (Figura 37A-C). Para el índice de actividad en ráfagas o *Burstiness Index* de las neuronas piramidales, se

observó que el rescate fenotípico tardío con los Tau-miRNAs en los ratones htau permitió alcanzar niveles similares al grupo WT (Figura 37D), mientras que los animales htau tratados con el Scr-miRNA presentaron valores significativamente mayores para este índice. Para las interneuronas, a pesar de no haber una diferencia significativa entre el grupo WT y el htau control, se observó una disminución en los valores del índice de actividad en ráfagas para el grupo htau Tau-miRNA respecto al htau Scr-miRNA (Figura 37E). En conclusión, el tratamiento tardío y sitio-específico con los Tau-miRNAs en el modelo htau moduló de forma significativa la actividad de las neuronas de la PFC, aunque los fenotipos electrofisiológicos fueron rescatados parcialmente respecto al grupo WT control.

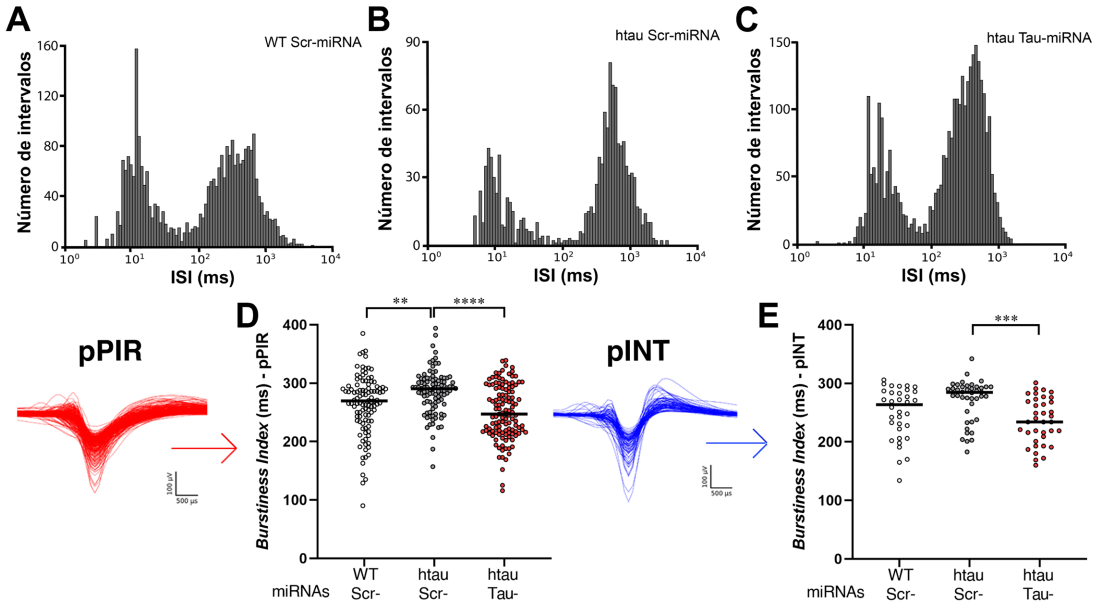



**Figura 37. La distribución de los disparos de las neuronas en la PFC del ratón htau es modulada por el tratamiento tardío con los Tau-miRNAs. A-C.** Histograma de intervalos entre disparos (ISIs, en inglés) para una neurona representativa de cada grupo tratado (en escala logarítmica). El agrupamiento de los ISIs en dos picos, para el cual uno de ellos se encuentra cercano a los 10 ms, indica que los disparos ocurrieron en forma de ráfagas en estas neuronas. **D-E.** Índice de actividad en ráfagas o *burstiness index* (BI) de las neuronas pPIR (**D**) y pINT (**E**) para cada grupo tratado. Para los gráficos D y E, cada punto representa el promedio del BI para cada neurona registrada a lo largo de la sesión. Las líneas negras representan la mediana para cada grupo. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn. ***p*<0,01, ****p*<0,001, *****p*<0,0001.

**Análisis del efecto del tratamiento tardío con los Tau-miRNAs en los niveles de tau patológica en la corteza prefrontal del ratón htau**

Al evaluar la marcación de p-tau en la PFC de los grupos tratados mediante inmunohistoquímica de cortes ultrafinos preparados por la técnica de *Array Tomography*, se observó una disminución en el número de cúmulos de p-tau en el grupo htau Tau-miRNA, aunque esta diferencia no fue significativa respecto del htau control (Figura 38A-B). No obstante, se detectó una menor colocalización de estos cúmulos con la marcación de sinapsina en los ratones htau tratados con los Tau-miRNAs, alcanzando valores similares al grupo WT (Figura 38 A y C). Por otro lado, no se observaron diferencias en el número de botones sinápticos entre tratamientos (Figura 38D).

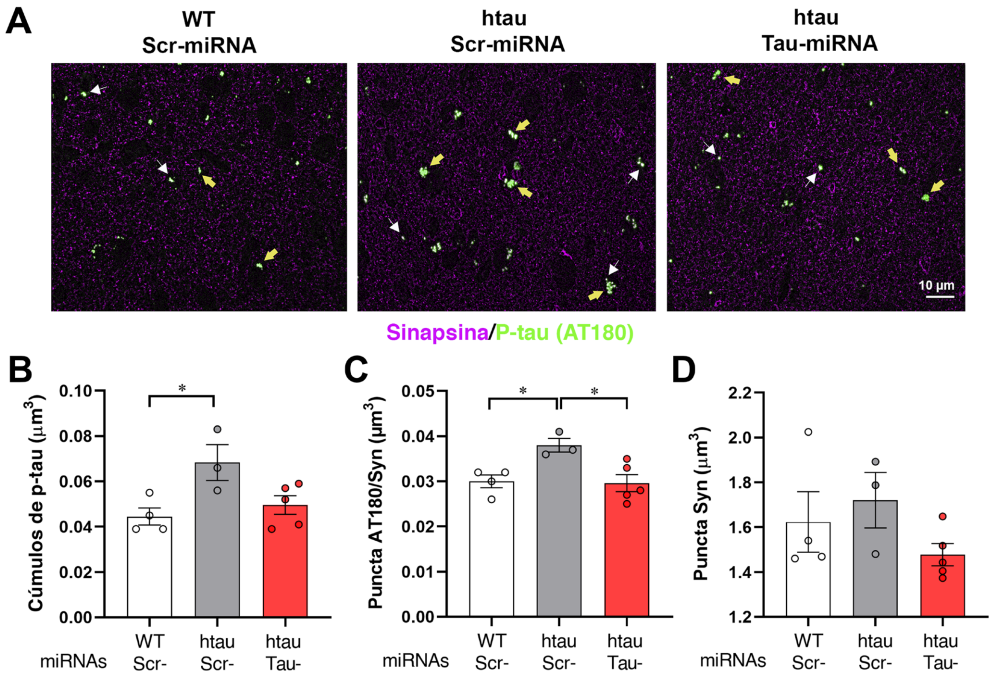



**Figura 38. El tratamiento tardío sitio-específico con los Tau-miRNAs disminuye la acumulación de p-tau en los botones sinápticos de la PFC de los ratones htau. A.** Imágenes representativas obtenidas por *Array Tomography* mostrando la marcación de p-tau (AT180, en verde) en los neuropilos sinápticos de la PFC de los ratones tratados con los amiRNAs. La acumulación de p-tau se marca con las flechas amarillas. Las flechas blancas indican la colocalización de AT180 con el marcador de presinapsis sinapsina 1a (en magenta). **B-D.** Análisis cuantitativo en la PFC de la densidad de: cúmulos de AT180 (**B**), botones sinápticos de p-tau/sinapsina (**C**) y botones sinápticos totales (**D**). WT Scr-miRNA n=4, htau Scr-miRNA n=3, htau Tau-miRNA n=5. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. **p*<0,05.

Concomitantemente, se obtuvieron resultados semejantes al analizar los niveles de tau insoluble en la PFC por Western blot. En el grupo htau tratado con los Tau-miRNAs se redujeron los niveles de tau insoluble en comparación con el htau Scr-miRNA, alcanzando valores similares al grupo WT control (Figura 39). Estos resultados sugieren que el tratamiento tardío con los microARNs artificiales dirigidos al ARN

mensajero de *MAPT*, revierte la acumulación patológica de tau en la PFC del ratón htau, demostrado a partir de la disminución de tau hiperfosforilada en los botones sinápticos y de tau insoluble fraccionada por sarkosyl.

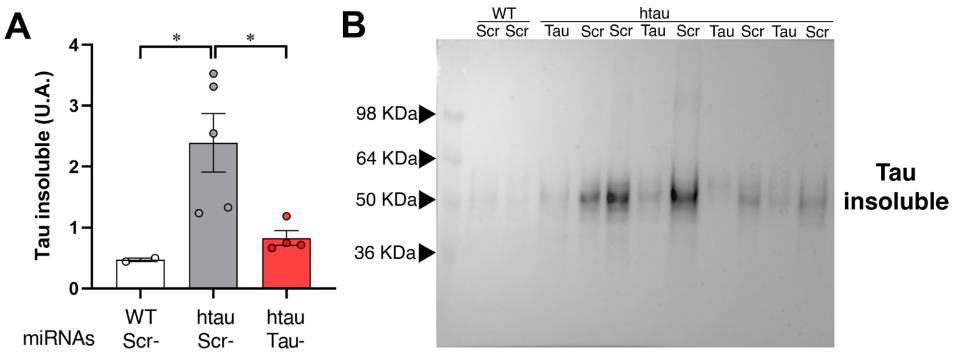



**Figura 39. El tratamiento tardío de los Tau-miRNAs de forma sitio-específica en los ratones htau disminuye los niveles de tau insoluble en la PFC. A-B.** Niveles de tau insoluble fraccionada por el reactivo de sarkosyl en la PFC de ratones de 12 meses tratados con los amiRNAs. **A.** Cuantificación del contenido de tau insoluble a partir de las membranas utilizadas en Western blot **(B)**. WT Scr-miRNA=2, htau Scr-miRNA=5, htau Tau-miRNA=4. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. *$p$<0,05.

El análisis de los niveles de p-tau medidos por Western blot, utilizando el anticuerpo PHF1 (marcación de la fosforilación patológica en S396 y S404), determinó que el tratamiento con los Tau-miRNAs en la PFC rescata los niveles de tau hiperfosforilada en los ratones htau (Figura 40A-B) y alcanza valores similares al grupo WT, en concordancia con lo observado mediante inmunohistoquímica. Por último, se pudo obtener una disminución significativa en los niveles de tau total de alrededor del 30% en el grupo htau Tau-miRNA en comparación con el grupo htau control (Figura 40C-D), equivalente a la reducción observada con el tratamiento temprano.

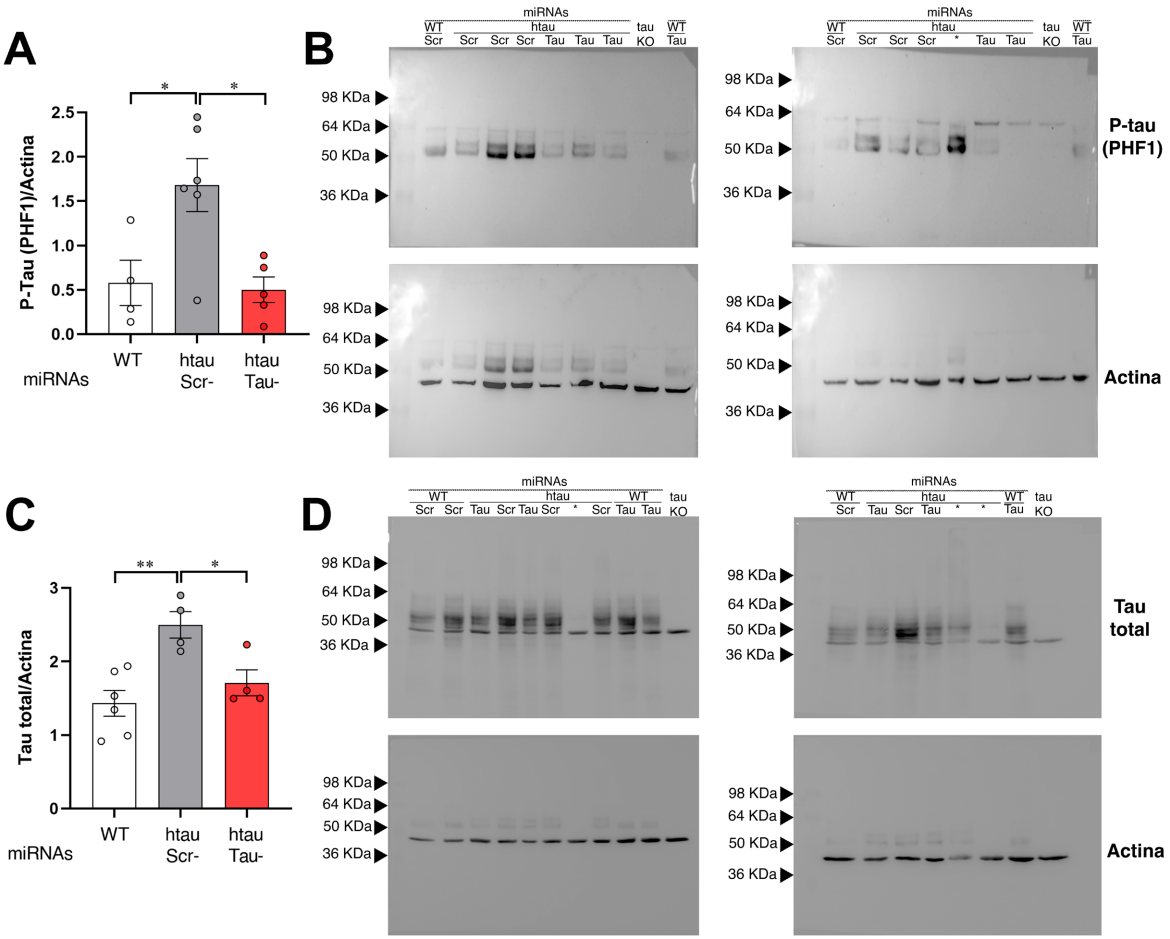



**Figura 40. El tratamiento tardío con los Tau-miRNAs reduce los niveles de p-tau y tau total en la PFC de ratones htau. A-B.** Niveles de p-tau (S396/S404) en la PFC de ratones de 12 meses tratados con los amiRNAs. **A.** Cuantificación del contenido de p-tau a partir de las membranas de Western blot **(B)**. WT=4, htau Scr-miRNA=6, htau Tau-miRNA=5. **C-D.** Niveles de tau total. **C.** Cuantificación del contenido de tau total a partir de las membranas de Western blot **(D)**. WT=6, htau Scr-miRNA=4, htau Tau-miRNA=4. Para ambos casos, se utilizó la marcación de actina como control de carga. tauKO: control negativo para la marcación de tau. *: o*utliers* no incluidos en el análisis. El grupo WT incluye muestras del grupo WT Scr-miRNA y WT Tau-miRNA, ya que se obtuvieron valores similares para los niveles de tau entre estos grupos. Datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. *$p$<0,05, **$p$<0,01.

En conjunto, los resultados de esta sección permiten concluir que el silenciamiento sitio-específico de tau mediante microARNs artificiales en ratones htau de 6 meses de edad, revirtió el déficit cognitivo presente en el ensayo de NOR, moduló la actividad eléctrica de las neuronas piramidales e interneuronas de la PFC y redujo la acumulación y fosforilación de tau patológica permitiendo rescatar fenotipos asociados a taupatías que ya se encontraban presentes en el modelo al momento de la inyección.

# DISCUSIÓN

Las taupatías son enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la acumulación anormal de la proteína tau en regiones específicas del cerebro, las cuales varían según la patología y suelen estar sinápticamente conectadas entre sí. El proceso por el cual determinadas áreas resultan más afectadas por la acumulación de tau patológica se conoce como vulnerabilidad regional selectiva, y es el principal determinante de las manifestaciones clínicas más prominentes observadas en los pacientes. En este contexto, a partir de las evidencias recientes y la sofisticación de los métodos de diagnóstico, uno de los principales desafíos de la investigación biomédica es desarrollar estrategias que permitan silenciar a la proteína tau de manera específica en las regiones primariamente involucradas. Esto tiene como objetivo frenar o disminuir el avance de la neurodegeneración, evitando al mismo tiempo una reducción global de tau en todo el cerebro, apuntando al desarrollo de estrategias versátiles, pero de alta precisión.

En esta tesis se abordó este desafío mediante el diseño y validación de una nueva herramienta molecular basada en microARNs artificiales dirigidos contra el ARN mensajero de *MAPT* (Tau-miRNAs). Para lograr una expresión localizada de estos constructos, se utilizaron vectores lentivirales administrados por inyección estereotáxica intraparenquimal en la corteza prefrontal del ratón htau, la cual representa una región vulnerable en este modelo de taupatía. A lo largo del presente trabajo de tesis se ha demostrado que los Tau-miRNAs son eficaces para inducir una reducción sostenida de la proteína tau, tanto en neuronas humanas diferenciadas en cultivo como en el cerebro del modelo htau. Esta estrategia ha permitido analizar las consecuencias funcionales del silenciamiento de tau y sus implicancias en los procesos neurodegenerativos. Los resultados obtenidos constituyen una prueba de concepto sólida para considerar a los Tau-miRNAs como una potencial estrategia terapéutica en el tratamiento de las taupatías.

Los resultados de validación de los Tau-miRNAs en el modelo de neuronas humanas diferenciadas en cultivo han permitido determinar la interacción de estos con su blanco, mecanismo conocido como *target engagement* en inglés, demostrado a través de la reducción significativa de alrededor del 75% en los niveles del ARN mensajero de *MAPT* y la proteína tau. Esto también ha sido evidenciado *in vivo* en el ratón htau, aunque en menor medida, a través de la disminución de alrededor del 30% del contenido de tau total en la corteza prefrontal del grupo tratado con los Tau-miRNAs. Es necesario remarcar que, si bien los ratones htau producen un mayor contenido de

isoformas 3R en el cerebro (Andorfer et al., 2003; Espíndola et al., 2018; Damianich et al., 2021), los Tau-miRNAs han sido diseñados para dirigirse a cualquiera de las isoformas generadas a partir del *splicing* alternativo del exón 10.

Aún con esta disminución parcial en los niveles de tau total en el modelo htau, en los ensayos *in vivo* demostramos que esta reducción ha sido suficiente para revertir la acumulación patológica de esta proteína, según fue determinado a través de la marcación de distintas especies tóxicas de tau. Particularmente para esta investigación, el silenciamiento mediado por los Tau-miRNAs *in vivo* ha generado una reducción significativa de los niveles de tau hiperfosforilada (p-tau) y tau insoluble, así como una caída en los niveles de p-tau en las sinapsis de la corteza prefrontal de los ratones htau. Si bien estos ensayos han sido empleados como indicadores de la presencia de tau patológica, también resultaría relevante analizar el efecto de los Tau-miRNAs sobre la reducción de otros marcadores de taupatía. Uno de los métodos de detección que se ha ido perfeccionando es el análisis de la actividad de *seeding* de tau, la cual puede medirse a partir de la extracción de proteínas del cerebro (Tennant et al., 2020; Frey et al., 2023). Este ensayo permitiría evaluar si el tratamiento con los Tau-miRNAs permite reducir conformaciones patológicas de tau asociadas al proceso de propagación tipo-priónica en las taupatías.

Trabajos anteriores han demostrado que el silenciamiento de alrededor del 50% de los niveles de tau total a través del uso de oligonucléotidos antisentido (ASOs), es suficiente para revertir la acumulación de tau patológica en el modelo murino de taupatía PS19 (DeVos et al., 2017). Esta estrategia además ha logrado disminuir los niveles de biomarcadores de taupatía en primates no humanos y en pacientes con EA en fase clínica Ib (DeVos et al., 2017; Mummery et al., 2023). Por lo tanto, el conjunto de estas evidencias demuestra que este enfoque terapéutico dirigido al transcripto de *MAPT*, resulta muy prometedor para el tratamiento de distintas taupatías, las cuales presentan diferentes agregados insolubles de tau (Chang, Shao, et al., 2021). Además, considerando que todavía no se conocen en profundidad todos los mecanismos implicados en la formación de especies tóxicas de tau que permiten el proceso neurodegenerativo, desde una perspectiva terapéutica resulta más parsimonioso poder dirigirse a silenciar la mayor cantidad posible de estas especies, las cuales podrían desencadenar otros procesos patológicos por sobre la muerte neuronal.

Más allá del eje central de esta investigación, centrado en evaluar las perspectivas terapéuticas del silenciamiento sitio-específico de tau, durante el desarrollo de esta tesis han surgido nuevas evidencias que aportan a la comprensión de su función

tanto fisiológica como patológica. A continuación, se discutirán los hallazgos más relevantes en el contexto de otras evidencias previamente reportadas.

## 1. Consecuencias funcionales del silenciamiento de tau en neuronas humanas *in vitro* derivadas de células madre pluripotentes inducidas

Con el fin de comprender las consecuencias funcionales del silenciamiento de tau a través de la estrategia de los Tau-miRNAs, además de evaluar el *target engagement* en neuronas humanas *in vitro* derivadas de células madre pluripotentes inducidas (hiPSC), analizamos sus efectos en la morfología neuronal y el transporte axonal, así como en la actividad eléctrica. Se observó que la reducción de tau fisiológica no generó cambios en las proyecciones de las neuritas y en las proporciones de partículas en el transporte anterógrado, retrógrado y en el estado estacionario. Sin embargo, se produjo una disminución significativa en la tasa de disparos, la amplitud del potencial de acción y las corrientes de $Na^+$ y $K^+$, que fue acompañada de cambios en la posición y la longitud del segmento inicial del axón (AIS).

### Morfología neuronal y transporte axonal

En este estudio, el análisis del silenciamiento de tau en neuronas humanas de 35-37 días en cultivo (DIV35-37) no mostró cambios significativos en la morfología neuronal, ya que los procesos y arborización de las neuritas no se modificaron ante el tratamiento con los Tau-miRNAs. Con respecto a las dinámicas de transporte axonal, se observó que el silenciamiento de tau no afecta las proporciones de vesículas de APP en el transporte anterógrado, retrógrado ni en el estado estacionario, tal como se había propuesto previamente para las mitocondrias (Vossel et al., 2015). Si bien la relevancia del rol de tau en estos mecanismos ha sido desafiada en estudios basados en la ablación genética total o parcial de tau (Yuan et al., 2008; Vossel et al., 2010, 2015), los resultados obtenidos en esta tesis sugieren un efecto facilitador sobre las dinámicas de transporte axonal, considerando el reclutamiento de un mayor número de vesículas de APP en el axón de las neuronas tratadas con los Tau-miRNAs. Previamente, nuestro grupo ha demostrado que el transporte axonal bidireccional se regula diferencialmente por cambios en el contenido de isoformas de tau en neuronas humanas diferenciadas *in vitro* (Lacovich et al., 2017). En dicho estudio, se propuso que las vesículas de APP estarían unidas a múltiples motores moleculares como las kinesinas y dineínas, y que un exceso de isoformas 3R o 4R (manteniendo constantes los niveles de tau total) induce cambios diferenciales en la dinámica del transporte anterógrado y retrógrado. Se hipotetizó que la resultante que determine la dirección de la vesícula o cargo depende de la competencia entre ambos motores por su movilidad, así como de la interacción

diferencial de tau con la kinesina, la cual ha sido demostrada previamente (Dixit et al., 2008). Un análisis más profundo sobre las consecuencias del silenciamiento de tau en las dinámicas de transporte axonal de neuronas humanas diferenciadas permitirá determinar los mecanismos que subyacen los efectos observados en esta investigación.

**Actividad eléctrica y localización del segmento inicial del axón**

En el marco de esta tesis, tau ha demostrado tener un rol relevante en la actividad eléctrica, según lo evidenciado por el análisis de los efectos de su silenciamiento en registros de *patch-clamp* en neuronas humanas diferenciadas en cultivo. El tratamiento con los Tau-miRNAs generó una reducción significativa en la actividad eléctrica, observada a través de la disminución en la tasa de disparos de potenciales de acción (PA), la amplitud del PA y las corrientes de $Na^+$ y $K^+$ en comparación con el grupo control. En un modelo de neuronas diferenciadas a partir de hiPSC de pacientes que presentaban una variante patogénica en *MAPT*, se observó una reducción en la excitabilidad y en las corrientes de $Na^+$ y $K^+$ para las neuronas mutantes, explicadas en parte por la disminución de la expresión del canal de sodio dependiente de voltaje $Na_V1.6$ (Kopach et al., 2020). Sin embargo, en este trabajo de tesis, no se observaron cambios en las propiedades intrínsecas de la membrana (tanto en el *threshold* como en la resistencia) por el tratamiento con los Tau-miRNAs. Esto indicaría que al menos en el reposo, la expresión de canales de sodio voltaje-dependientes no parecería estar afectada por el silenciamiento de tau. Una de las posibilidades que podrían explicar esta reducción en la actividad eléctrica, es que, si bien no se afecta el número de canales de sodio voltaje-dependientes, se podría modular la cinética de activación o de inactivación de estos por el tratamiento con los Tau-miRNAs. A partir de ensayos adicionales, como por ejemplo registros de *patch-clamp* utilizando farmacología para discriminar las distintas conductancias macroscópicas, o mediante una caracterización bioquímica de la expresión de canales se podrá tener una mayor comprensión sobre estos mecanismos. Por otro lado, la reducción en los niveles de tau podría tener consecuencias en la actividad eléctrica por fallas en la liberación de vesículas sinápticas, ya que, en los experimentos de dinámicas de transporte, se observó un aumento en el número de vesículas de APP en los axones. Si bien estos mecanismos en general se han asociado con variantes patogénicas de tau (Zhou et al., 2017; McInnes et al., 2018), resultaría interesante poder analizar si estos cambios observados en las dinámicas de transporte axonal se reflejan en posibles alteraciones en la liberación de las vesículas de APP frente al tratamiento con los Tau-miRNAs. Particularmente en esta tesis, como correlato de los cambios observados en

la actividad eléctrica, se analizó el efecto del silenciamiento de tau en el segmento inicial del axón (AIS), estructura fundamental para la iniciación del PA (Grubb y Burrone, 2010).

La ablación genética de tau ha demostrado que afecta diferencialmente la posición y longitud del AIS de las neuronas piramidales e interneuronas de la corteza de ratones *Mapt*$^{-/-}$ (Chang, Evans, et al., 2021). Estos cambios en la localización del AIS se acompañaron de efectos antagónicos en la actividad eléctrica de los distintos tipos neuronales frente a la ausencia de tau, evidenciados por una disminución en la tasa de disparos espontáneos de las neuronas piramidales, mientras que la excitabilidad de las interneuronas se encontraba aumentada. Sin embargo, no se ha logrado determinar si estos cambios antagónicos se deben a mecanismos intrínsecos asociados a la interacción molecular entre tau y el AIS (Li et al., 2011; Sohn et al., 2019) o se manifiestan como respuestas adaptativas según los *inputs* eléctricos recibidos por el tipo neuronal opuesto (Grubb y Burrone, 2010; Kuba et al., 2010). En esta tesis, observamos que el silenciamiento de tau en neuronas diferenciadas disminuyó la distancia al soma y aumentó la longitud del AIS en un contexto de actividad eléctrica reducida. Estos resultados demuestran que la disminución observada en la tasa de disparos de potenciales de acción y las corrientes registradas por *patch-clamp* se encuentra acompañada de modificaciones a nivel molecular en las neuronas tratadas con los Tau-miRNAs, las cuales indicarían un potencial mecanismo compensatorio en la localización del AIS. Considerando que se ha demostrado una interacción directa entre tau y componentes del AIS como se mencionó anteriormente, experimentos subsiguientes serán necesarios para determinar si el tratamiento con los Tau-miRNAs afecta esta relación, como por ejemplo a través de la evaluación de la plasticidad del AIS en un contexto despolarizante o el análisis estructural de sus componentes.

## 2. Consecuencias funcionales de la acumulación patológica de tau

Por otro lado, se caracterizó al modelo murino de taupatía htau, con el fin de evaluar los fenotipos asociados a la acumulación de tau patológica en este ratón. La determinación de un aumento en la actividad eléctrica y cambios metabólicos a partir de la medición de FDG-PET en la corteza prefrontal, así como la presencia del déficit cognitivo en el ensayo de NOR desde los 6 meses de edad, permitió definir a esta estructura como una región vulnerable en el modelo y determinar la ventana temporal para la evaluación del rescate fenotípico con los Tau-miRNAs.

### Cambios en la actividad eléctrica y metabólica

En el modelo de taupatía htau, se había descripto la presencia de agregados intracelulares de tau en la corteza prefrontal de ratones envejecidos (Espíndola et al.,

2018), así como en la neocorteza y el hipocampo (Andorfer et al., 2003). En este trabajo de tesis, se observó la presencia de tau insoluble en la corteza prefrontal de ratones htau desde los 3 meses de edad, al igual que en estudios previos (Andorfer et al., 2003). Con el fin de evaluar si este modelo presentaba fenotipos asociados a la disfunción de la corteza prefrontal por la acumulación patológica de tau, se realizaron registros de campo *in vivo* en dicha estructura a lo largo de distintas edades. En los ratones htau, se observó un aumento progresivo en la tasa de disparos de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal con el envejecimiento, siendo significativamente mayor al grupo WT a los 12 meses. Esto no ocurrió para el curso temporal de la tasa de disparos de las interneuronas, sugiriendo que la acumulación patológica de tau podría afectar diferencialmente a estos tipos neuronales de la corteza prefrontal, en un mecanismo asociado a la vulnerabilidad selectiva celular (Fu et al., 2018, 2019). En otros modelos de taupatía, se ha demostrado que la sobreexpresión y/o presencia de variantes patogénicas de tau conduce a una actividad epiléptica o a una mayor predisposición a la misma en ratones adultos (García-Cabrero et al., 2013; Wheeler et al., 2015; Maeda et al., 2016; Das et al., 2018). Adicionalmente, en ratones WT, se ha estudiado que la concentración de tau fisiológica correlaciona de forma inversa con la latencia a ataques epilépticos inducidos, lo que indicaría que un aumento en la concentración de tau genera una mayor susceptibilidad a este tipo de actividad eléctrica desregulada (DeVos et al., 2013).

Con el fin de evaluar si la hiperactividad observada en las neuronas de la corteza prefrontal se traducía en cambios en la actividad metabólica de esta región, se realizó una caracterización temporal del modelo htau en la captación de 18F-FDG por PET. Este análisis en pacientes con enfermedades neurodegenerativas se encuentra asociado principalmente a medir la captación de este análogo de glucosa como correlato de la actividad neuronal, siendo utilizado como herramienta de diagnóstico temprano (Teune et al., 2010). Debido al incremento en la tasa de disparos de las neuronas piramidales de los ratones htau, las cuales representan el tipo neuronal más abundante en la corteza prefrontal, se hubiera esperado que esta región en su conjunto presente una mayor actividad eléctrica con el envejecimiento en este modelo. Sin embargo, se observó entre los 6 y 12 meses de edad, en la corteza prefrontal y particularmente en la región prelímbica, una menor captación de 18F-FDG. Si bien estos resultados parecerían ser contradictorios entre sí, una posible explicación es que, en el ratón htau, se produzca un aumento de la muerte neuronal con la edad, mientras que las neuronas remanentes incrementen su actividad eléctrica como mecanismo compensatorio para mantener la integridad funcional de la región analizada.

En otro modelo de taupatia, el raton rTg4510, el análisis de 18F-FDG ha demostrado una disminución significativa en la captación de glucosa en la corteza frontal a los 7 meses (Endepols et al., 2022). En este mismo modelo, se ha observado que, a los 9 meses de edad, a pesar de haberse reportado la presencia de abundantes agregados de tau patológica y la pérdida de alrededor del 50% de las neuronas corticales totales, la corteza prefrontal presenta una incrementada actividad sináptica (Crimins et al., 2011). En ese trabajo se ha sugerido que el aumento en la excitabilidad junto con la brotación de nuevos botones sinápticos y filopodios en los axones permitiría mantener la homeostasis de las redes sinápticas de esta región. Con respecto al ratón htau, se ha demostrado que el grosor de la corteza disminuye entre los 10-14 meses de edad (Andorfer et al., 2005). Asimismo, en las sinapsis de las colaterales de Schaffer de las neuronas de la región CA3 hacia las neuronas de la región CA1 del hipocampo, se ha observado en ratones htau envejecidos una menor probabilidad de liberación presináptica, así como una incrementada excitabilidad en las neuronas de la CA3 (Polydoro et al., 2009). Estos mecanismos probablemente compensatorios en el hipocampo del modelo htau, al igual que las diferencias observadas en esta tesis entre la actividad eléctrica aumentada y la disminución en la captación de 18F-FDG en la corteza prefrontal, podrían ocurrir a partir de un remodelado de los circuitos neuronales en estas regiones, con el fin de mantener la integridad de su función ante la acumulación patológica de tau.

Dentro de los mecanismos homeostáticos propuestos por Crimins et. al, los resultados obtenidos en esta tesis en la actividad de la corteza prefrontal de ratones htau podrían explicarse por trabajos anteriores que muestran en estos ratones alteraciones en la arquitectura de las dendritas y cambios en la morfología de las espinas de las neuronas de esta misma región del cerebro (Dickstein et al., 2010). Por otro lado, en un estudio previo en el modelo htau, si bien no se detectaron cambios en el número de *puncta* de marcadores sinápticos en la región CA1 del hipocampo, se observaron cambios en el perfil de expresión de genes asociados a la sinapsis (Alldred et al., 2012). Asimismo, diversos trabajos han investigado los efectos de la acumulación patológica de tau en el compartimento presináptico, los cuales afectaban la transmisión sináptica (Zhou et al., 2017; McInnes et al., 2018; Decker y Mandelkow, 2019, pp. 97-104). En cuanto a la densidad postsináptica, la evidencia disponible es variable, ya que se ha observado que la ausencia de tau o la presencia de especies tóxicas de esta proteína pueden inducir cambios en la función y plasticidad sinápticas, a través de alteraciones en el tráfico o la localización de receptores (Hoover et al., 2010; T. Ahmed et al., 2014; Kimura et al., 2014; X. Zhao et al., 2016). Por lo tanto, para entender las

modificaciones observadas en la electrofisiología y el metabolismo de las neuronas de la corteza prefrontal de ratones htau envejecidos, resultaría relevante poder evaluar ensayos adicionales, como por ejemplo, registros de *patch-clamp* con el fin de determinar las contribuciones de cada tipo neuronal en la actividad eléctrica de la corteza prefrontal, así como analizar la abundancia de componentes estructurales y funcionales de las sinapsis mediante técnicas de fraccionamiento de sinaptosomas y *Array Tomography*, las cuales también han permitido detectar especies tóxicas de tau (Kopeikina et al., 2013; Colom-Cadena et al., 2023). A partir de este trabajo de tesis, estos análisis se llevarán a cabo en el laboratorio en el marco de nuevas líneas de investigación, las cuales permitirán elucidar el rol de tau patológica en las sinapsis y en sus efectos en la fisiología neuronal.

**Déficits cognitivos frente a la acumulación patológica de tau**

Se ha demostrado que la acumulación de tau patológica en el ratón htau precede a la aparición de determinados déficits cognitivos, además de interferir en la transmisión y la función presináptica (Polydoro et al., 2009). En la caracterización de los fenotipos comportamentales del ratón htau en esta tesis, también se ha observado que la acumulación de tau insoluble en la corteza prefrontal del ratón htau precede a la aparición del déficit en el ensayo de reconocimiento de objeto novedoso (NOR), fenotipo que se hace evidente a partir de los 6 meses de edad y se mantiene, al menos, hasta los 12 meses, como se ha visto previamente para este último caso (Polydoro et al., 2009). Asimismo, se han observado fenotipos de desinhibición tempranos en el modelo, a partir de los porcentajes de tiempo en el centro para el ensayo de campo abierto y de tiempo en los brazos abiertos para el laberinto en cruz elevado. Estos fenotipos, los cuales se encuentran más asociados a conductas propias de la demencia frontotemporal (Rabinovici y Miller, 2010), se atenúan con el envejecimiento en los ratones htau, prevaleciendo finalmente el déficit cognitivo en el ensayo de NOR. Por otro lado, la existencia de fenotipos motores como la hiperlomoción observada en el ensayo de campo abierto demuestran que otras estructuras asociadas se encuentran afectadas por tau patológica en este modelo, tal como se ha mostrado anteriormente (Damianich et al., 2021).

Distintos ensayos implicados en el reconocimiento de objetos se han asociado a la integridad funcional de la corteza prefrontal medial, la corteza perirrinal y el hipocampo (Morici et al., 2015), regiones que se encuentran funcionalmente conectadas entre sí. Si bien el paradigma de ensayo de NOR utilizado en esta tesis evalúa la exploración espontánea de objetos (Leger et al., 2013), resultaría interesante poder analizar en el modelo otros fenotipos comportamentales asociados a la corteza prefrontal. Por

ejemplo, pruebas alternativas de reconocimiento de objetos (Morici et al., 2015), ensayos de memoria de trabajo espacial (Dudchenko, 2004), los cuales requieren de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal (Vogel et al., 2022), o pruebas asociadas a la interacción social (Yizhar y Levy, 2021). Aun considerando estos aspectos, la aparición del déficit cognitivo en el ensayo de NOR coincide con la reducción en la captación de 18F-FDG y el incremento en la actividad eléctrica en la corteza prefrontal del ratón htau. Por lo tanto, el conjunto de estos parámetros resultó suficiente para definir a la corteza prefrontal como una estructura vulnerable a tau patológica en el modelo htau, al igual que ocurre en diversas taupatías (Rabinovici y Miller, 2010; Fu et al., 2018; Forrest et al., 2019; Götz et al., 2019). A partir de la caracterización temporal del ratón htau, se ha determinado a los 6 meses como la edad en la cual los fenotipos patológicos asociados a la corteza prefrontal se manifestaban en su mayoría, por lo cual se definió la ventana de intervención para el tratamiento con los Tau-miRNAs de forma presintomática y sintomática en este modelo.

## 3. Implicancias del silenciamiento de tau en procesos neurodegenerativos

Una vez establecidos los fenotipos asociados a la acumulación patológica de tau en la corteza prefrontal y la edad que determina el *onset* fenotípico en el modelo htau, se realizaron las inyecciones localizadas de los Tau-miRNAs de forma pre (a los 3 meses) y postsintomática (a los 6 meses de edad). Además de revelar *target engagement,* el uso de estos amiRNAs dirigidos al ARN mensajero de *MAPT* demostraron la capacidad de: modular la incrementada actividad eléctrica de las neuronas de la corteza prefrontal, prevenir la reducción en la captación de 18F-FDG dependiente de la edad, y revertir los déficits cognitivos en el ratón htau.

### Implicancias del silenciamiento de tau en la modulación de la actividad eléctrica y metabólica en contextos patológicos

Los resultados de esta tesis mostraron una disminución en la actividad eléctrica mediante el tratamiento con los Tau-miRNAs, tanto en neuronas humanas diferenciadas como en la corteza prefrontal del ratón htau. Con respecto a los registros de campo *in vivo*, se ha demostrado que el tratamiento temprano de los Tau-miRNAs en los ratones htau fue suficiente para prevenir el aumento en la tasa de disparos de las neuronas piramidales observada a los 12 meses de edad, alcanzando valores similares al grupo WT control. Efectos similares se observaron en el tratamiento realizado a los 6 meses con respecto al grupo htau control, aunque la disminución en la tasa de disparos de este tipo neuronal no alcanzó valores equivalentes al grupo WT. Estas diferencias observadas en el efecto del silenciamiento de tau sobre las neuronas piramidales

podrían atribuirse a la temporalidad de las inyecciones, ya que en la corteza prefrontal del modelo htau observamos que, a pesar de no haber una diferencia significativa a los 6 meses de edad, existe una tendencia a una mayor tasa de disparos en este tipo neuronal en comparación con el grupo WT. Esto podría significar que, con respecto a los cambios en la actividad eléctrica, una intervención postsintomática o cercana a la aparición del fenotipo, si bien podría mejorar la sintomatología, no sería suficiente para revertirla. Estos resultados destacan la importancia del estudio del rol de tau en la actividad eléctrica en contextos patológicos, tanto para la identificación de marcadores como para la evaluación del deterioro cognitivo (Jafari et al., 2020; Ozdemir et al., 2020; Tăuţan et al., 2023).

En el caso de las interneuronas, el silenciamiento de tau presintomático no afectó la tasa de disparos en los ratones htau, tal como se ha observado en la caracterización temporal de los registros de campo *in vivo* en el modelo. Resulta relevante señalar que, en las inyecciones postsintomáticas, se observó no sólo un aumento significativo en la tasa de disparos de las interneuronas del grupo htau Scr-miRNA respecto al control WT, sino también una disminución de esta a partir del tratamiento con los Tau-miRNAs. Las diferencias observadas en la tasa de disparos de las interneuronas entre los registros de la caracterización de la actividad eléctrica y los obtenidos por los tratamientos control podrían atribuirse a la variabilidad inherente a la técnica y análisis utilizados, considerando el bajo número de neuronas registradas. Adicionalmente, en aquellos casos en los cuales se observaron cambios significativos en la tasa de disparos de las neuronas de la corteza prefrontal en los ratones htau, el tratamiento con los Tau-miRNAs también ha demostrado modular la distribución o el patrón de esos disparos. Los histogramas de ISIs, que reflejan la distribución de los tiempos entre disparos, demuestran que en todos los grupos analizados hay neuronas que presentan ráfagas de disparos o *bursts*, los cuales han sido analizados a través del índice de actividad en ráfagas o *burstiness index*. El grupo htau Scr-miRNA presentó una mayor actividad en forma de *bursts* en comparación con el grupo WT, la cual fue rescatada a partir del tratamiento con los Tau-miRNAs, principalmente para las neuronas piramidales. Si bien el promotor que dirige la expresión de los Tau-miRNAs es de sinapsina 1, lo que implicaría que el silenciamiento de tau ocurra en ambos tipos neuronales, la diferencia observada en la modulación de la actividad eléctrica podría atribuirse a un mayor alcance de la estrategia en las neuronas piramidales, dada su gran abundancia en la corteza prefrontal (Le Merre et al., 2021), o alternativamente, esto podría reflejar un mecanismo de acción de tau asociado a la vulnerabilidad selectiva neuronal. Como se comentó anteriormente, se ha demostrado que la ausencia de tau genera cambios

diferenciales en la actividad eléctrica de las neuronas piramidales y las interneuronas en la corteza somatosensorial de ratones *Mapt*$^{-/-}$, la cual ha disminuido la hipersincronía de redes, evento íntimamente asociado a condiciones de actividad epiléptica (Chang, Evans, et al., 2021).

Los mecanismos de tau en la actividad eléctrica todavía no se han elucidado completamente, sin embargo, se ha estudiado exhaustivamente el rol facilitador de esta proteína en contextos de excitotoxicidad o actividad epiléptica, en modelos de enfermedades neurológicas que no se asocian necesariamente con la acumulación patológica de tau (Roberson et al., 2007; Ittner et al., 2010; DeVos et al., 2013; Gheyara et al., 2014; Bi et al., 2017). Uno de los primeros mecanismos descriptos para tau fue a través de su interacción con la quinasa Fyn, la cual favorece la excitotoxicidad inducida por la acumulación extracelular de Aβ y su asociación con el receptor de NMDA (Ittner et al., 2010). Esta hipótesis, que postula a los oligómeros de Aβ como aquellos que desencadenan este mecanismo, encuentra sustento en la alta prevalencia de casos de epilepsia en pacientes con EA, de los cuales el 60% aproximadamente presenta convulsiones y actividad epiléptica subclínica (Hwang et al., 2022). Aunque la incidencia de actividad epiléptica en las taupatías primarias es mucho menor que en la EA, no debe descartarse la posibilidad de su ocurrencia, ya que se ha demostrado una mayor frecuencia de hiperactividad y ataques epilépticos en comparación con la población general (Hwang et al., 2022). Esta desregulación en la fisiología neuronal podría ser un potencial marcador de una forma más agresiva de la patología o bien formar parte de una red hiperactiva que contribuye al deterioro cognitivo. Una hipótesis propone que los efectos deletéreos de la actividad epiléptica en la cognición de pacientes con EA ocurren con mayor frecuencia por el constante remodelado de circuitos neuronales, más que por las interrupciones abruptas en sus funciones (Palop y Mucke, 2010). Comprender cuáles son estos mecanismos compensatorios y cuál será el beneficio de silenciar tau en estos circuitos neuronales desregulados serán preguntas por resolver en el futuro. Además, considerando que los incrementos en la actividad eléctrica favorecen la liberación de tau extracelular (Pooler et al., 2013; Yamada et al., 2014) y aceleran la formación de agregados de esta proteína *in vivo* (Wu et al., 2016), el uso de los Tau-miRNAs dirigido a regiones vulnerables en taupatías podría resultar beneficioso no sólo para reducir la acumulación patológica de tau, sino también para modular los aumentos en la actividad eléctrica y el posible avance del proceso neurodegenerativo.

Así como se observó una caída en la actividad eléctrica de las neuronas de la corteza prefrontal, el tratamiento presintomático con los Tau-miRNAs previno el decaimiento en la captación de 18F-FDG en la región inyectada en ratones htau

envejecidos. De forma inversa a lo observado para la caracterización temporal del ratón htau, a menor actividad eléctrica neuronal, el metabolismo de glucosa y por lo tanto la captación de su análogo fueron mayores para el grupo htau tratado con los Tau-miRNAs. Asimismo, se observó que otras regiones del cerebro de estos ratones presentaron cambios en la captación de 18F-FDG frente al silenciamiento de tau localizado y posiblemente por la modulación en la actividad eléctrica de la corteza prefrontal. Como se discutió anteriormente, estos mecanismos podrían asociarse al remodelado o cambios en los circuitos neuronales de esta región, como por ejemplo en la densidad o la arborización de las dendritas, en la densidad de botones sinápticos, o en la expresión o el anclaje de componentes de las sinapsis como los receptores de NMDA o AMPA, presentando efectos sobre regiones cercanas o sinápticamente conectadas entre sí. Considerando que el tratamiento presintomático con los Tau-miRNAs en la corteza prefrontal fue previo a la aparición del fenotipo observado en la caracterización temporal del modelo htau por FDG-PET, resultaría de mayor relevancia clínica poder determinar si el rescate también se manifiesta en ratones htau inyectados luego del *onset* fenotípico. Si bien el análisis de la captación de 18F-FDG por PET puede ser utilizado como herramienta de diagnóstico temprano y medir la evolución de un tratamiento, es necesario remarcar que se han desarrollado biomarcadores más específicos para taupatías, dentro los cuales se encuentran otros ligandos de PET para marcar tau patológica, imágenes de resonancia magnética, el análisis de biomarcadores de líquido cefalorraquídeo y plasma, entre otros (Jack et al., 2018; Shaw et al., 2018).

**Implicancias del silenciamiento de tau en el deterioro cognitivo: consideraciones sobre el uso de modelos murinos de taupatías**

A lo largo de este estudio se ha demostrado que el tratamiento dirigido de los Tau-miRNAs a la corteza prefrontal del modelo htau fue suficiente para revertir y prevenir el déficit cognitivo observado en el ensayo de NOR en ratones envejecidos. En este paradigma experimental, el déficit cognitivo del grupo htau control se caracteriza por una exploración al azar de los objetos, sin evidenciar la capacidad de discriminar el objeto novedoso. Sin embargo, el silenciamiento de tau permitió rescatar este fenotipo, generando en los ratones htau tratados un comportamiento similar a los controles WT. En trabajos anteriores, se ha observado que el rescate y la prevención utilizando otro enfoque terapéutico en la corteza prefrontal también mejoraba este fenotipo en los ratones htau envejecidos (Espíndola et al., 2018; Muñiz et al., 2022). Con fines de poder validar los fenotipos presentes en el modelo tal como los observados para la caracterización, en algunas cohortes de animales se realizó la batería de ensayos comportamentales antes de la inyección. Tanto para la inyección presintomática (3

meses) como la sintomática temprana (6 meses) se obtuvieron resultados similares en los distintos ensayos previos al tratamiento. Particularmente, considerando que los ratones htau presentan su *onset* fenotípico a los 6 meses de edad en el ensayo de NOR, se evaluó el índice de discriminación antes y después del tratamiento para un grupo reducido de animales. Se observó que el grupo htau tratado con los Tau-miRNAs mostró una reversión del déficit cognitivo, aportando evidencia de relevancia clínica para el uso de esta estrategia terapeútica. Asimismo, se observaron efectos similares en el tratamiento de los Tau-miRNAs entre machos y hembras. Para otros fenotipos determinados en los ensayos de laberinto en cruz elevado o el campo abierto, no se evidenciaron cambios en cualquiera de los tratamientos, ya que los fenotipos asociados a la desinhibición se atenúan con la edad en el ratón htau. Por otro lado, la hiperlocomoción presente en este modelo parecería estar asociada en menor medida al funcionamiento conservado de la corteza prefrontal, como se mencionó anteriormente.

Los resultados de rescate fenotípico comportamental resultan relevantes al considerar el uso de los Tau-miRNAs como una potencial herramienta terapéutica, ya que uno de los principales síntomas clínicos en los pacientes con taupatías es la pérdida de la función cognitiva. Sin embargo, es importante mencionar que, dentro de la comunidad científica dedicada al desarrollo de terapias para las taupatías y otras enfermedades neurodegenerativas, existe una controversia entre priorizar únicamente el logro del *target engagement* o si, complementariamente, se debería dar relevancia a la reversión de los fenotipos comportamentales en modelos murinos relevantes para estas patologías. Esta discusión surge tras años de fracaso de diversas estrategias terapéuticas, para las cuales sus efectos en ensayos preclínicos no logran la misma replicabilidad y éxito cuando se trasladan a los pacientes (Commins y Kirby, 2019).

Los aspectos histológicos y bioquímicos más fuertes asociados a tau patológica han sido logrados en modelos murinos de sobreexpresión de variantes patogénicas de *MAPT*, los cuales son muy utilizados para los ensayos preclínicos de distintas estrategias terapéuticas para taupatías, mayoritariamente para la EA. Sin embargo, dentro de las taupatías primarias, aproximadamente el 10% de los casos corresponde a formas familiares asociadas a variantes patogénicas en el gen *MAPT* (Forrest, Halliday, et al., 2019), por lo que la mayoría de los pacientes que padecen estas patologías presentan formas esporádicas. Adicionalmente, en la EA los casos hereditarios no han sido asociados a este gen (Goedert, 2015). En este contexto, se han intentado generar modelos murinos que expresen el gen *MAPT* humano sin variantes patogénicas, como por ejemplo el ratón htau utilizado en esta tesis, aunque este presenta cierta sobreexpresión y en el procesamiento o *splicing* del ARN primario genera

un mayor contenido de la isoforma de tau 3R (Andorfer et al., 2003). Asimismo, para evitar los efectos de la sobreexpresión en la acumulación de tau, se generaron modelos murinos de *knock-in* (Gilley et al., 2012) o de humanización del gen *Mapt* de ratón (Saito et al., 2019), sin embargo, estos han fallado en recapitular la patología. Otra de las estrategias utilizadas para modelar las taupatías *in vivo*, es a través de la expresión localizada de variantes patogénicas de tau en ciertas regiones del cerebro, considerando los mecanismos de vulnerabilidad selectiva (Harris et al., 2012; Liu et al., 2012; Wegmann et al., 2019), aunque la aparición de ciertos fenotipos ocurre a edades muy avanzadas en estos ratones (Fu et al., 2017). Por lo tanto, existe una gran heterogeneidad en la patología de la mayoría de los modelos preclínicos de taupatía, los cuales pueden variar en: los tipos de isoformas y modificaciones postraduccionales de tau, las variantes patogénicas asociadas a *MAPT*, los patrones de distribución y la temporalidad de acumulación de tau patológica, los promotores y por lo tanto los grados de sobreexpresión del transgén de tau humana, entre otros (Götz y Götz, 2019, pp. 381-392). En conclusión, reconocer todas estas limitaciones será indispensable para la interpretación de los resultados obtenidos en modelos preclínicos de los mecanismos patológicos y el uso de estrategias terapéuticas en las taupatías.

## 4. Silenciamiento de tau dirigido a regiones vulnerables en taupatías: perspectivas y desafíos futuros

El silenciamiento de tau resulta actualmente la estrategia más promisoria para el tratamiento de las taupatías (Chang, Shao, et al., 2021), sin embargo, los enfoques terapéuticos utilizados en ensayos clínicos presentan un mecanismo de acción globalizado y a corto término. En este trabajo de tesis, se logró validar el uso sitio-dirigido de los Tau-miRNAs para revertir los niveles de tau patológica y fenotipos asociados a una estructura vulnerable en el modelo htau, la corteza prefrontal. El desarrollo de biomarcadores específicos junto con terapias de precisión que contemplen los mecanismos de vulnerabilidad selectiva, así como los efectos del silenciamiento de tau a largo plazo, permitirán refinar las estrategias presentes hoy en día y generar un nuevo paradigma para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

### Silenciamiento de la proteína tau: evidencias a partir de modelos preclínicos y de ensayos clínicos en pacientes

Si bien los modelos preclínicos presentan limitaciones y han demostrado ciertas falencias en la traslación de distintos fármacos a ensayos en pacientes, la evidencia a lo largo de los años ha permitido elucidar diversos mecanismos patológicos en las taupatías, cambiando el enfoque de las estrategias terapéuticas para estas

enfermedades. En las taupatías primarias, tau representa un claro blanco terapéutico ya que esta es la causa directa de la patología. Sin embargo, para la EA, la falla en múltiples ensayos clínicos de fase III de drogas contra Aβ ha direccionado el desarrollo de terapias hacia tau patológica, la cual ha demostrado una mejor correlación con el deterioro cognitivo en pacientes, en comparación con las placas β-amiloides. En los ensayos dirigidos a tau, los primeros enfoques se centraron en la disminución o *clearance* de especies tóxicas de la misma, como ciertos tipos de agregados o modificaciones postraduccionales patológicas, sin embargo, estos han sido discontinuados por efectos de toxicidad o falta de eficacia en los pacientes (Chang, Shao, et al., 2021). A causa de los resultados negativos de estos enfoques previos, junto con la evidencia que demuestra el beneficio de la ablación genética de tau sin generar cambios perjudiciales en el cerebro adulto (Roberson et al., 2007; Ittner et al., 2010; Bi et al., 2017; Das et al., 2018; Tai et al., 2020), la reducción en los niveles globales de tau ha surgido como la más prometedora de las estrategias terapéuticas.

Dentro del enfoque dirigido a reducir los niveles de tau, la inmunoterapia es la estrategia que actualmente involucra más ensayos clínicos en curso (Lane-Donovan y Boxer, 2024). Esta se dirige a distintos dominios de tau liberada al espacio extracelular basándose en el mecanismo de propagación tipo-priónica de esta proteína. Si bien la liberación y receptación de tau extracelular ha sido demostrada en diversos modelos como se mencionó anteriormente, todavía no se ha logrado determinar si esta presenta la capacidad de inducir efectos tóxicos en las células aceptoras (Chang, Shao, et al., 2021), así como si su reducción mediante anticuerpos es suficiente para frenar el avance del proceso neurodegenerativo. Con los fines de silenciar los niveles intracelulares de tau dirigiéndose río arriba en el mecanismo de formación de especies patológicas de esta proteína, surgen las estrategias de terapia génica como un enfoque terapeútico alternativo para las taupatías. Dentro de este campo, el uso de ASOs es considerada la herramienta más desarrollada y verosímil por sus resultados en la atrofia muscular espinal (Bennett, 2019). El uso de ASOs contra tau *in vivo* ha demostrado ser protector ante ataques epilépticos inducidos (DeVos et al., 2013), además de revertir la acumulación de tau patológica, la actividad de *seeding* y la pérdida neuronal en el modelo de taupatía PS19 (DeVos et al., 2017). Su tolerancia en primates no humanos y los resultados en el modelo de taupatía han sido suficientes para evaluar su seguridad y *target engagement* en fase Ib de ensayos clínicos para la EA (Mummery et al., 2023). Las siguientes fases de este ensayo clínico serán necesarias para evaluar la hipótesis que propone que el silenciamiento de tau permite disminuir o revertir la progresión de la enfermedad, con beneficios clínicos en la cognición de los pacientes.

**Mecanismos de vulnerabilidad selectiva y biomarcadores para el diseño de nuevas terapéuticas dirigidas al silenciamiento de tau**

Dado el gran avance en el uso de diversos biomarcadores, las imágenes de PET que detectan especies patológicas de tau serán de gran relevancia en el diagnóstico temprano de taupatías en períodos asintomáticos (Higuchi, 2019, pp. 217-230). Esto permitirá poder definir la ventana temporal óptima para la cual la aplicación de un tratamiento sea suficiente para enlentecer o revertir el curso de la patología, antes de la aparición de los fenotipos clínicos. Si el agente utilizado para las imágenes de tau-PET es acertado, este permitirá predecir las manifestaciones clínicas en los pacientes. De hecho, se ha demostrado que los niveles de tau covarían entre regiones funcionalmente conectadas, por lo que se pueden encontrar niveles similares de esta proteína entre redes funcionales delimitadas para distintas taupatías (Franzmeier et al., 2020, 2022). Esto sustentaría la hipótesis de propagación *trans*-sináptica de tau demostrada en diversos modelos preclínicos, a partir de la cual mediante los análisis de tau-PET se podrían predecir tanto el *spreading* de tau patológica como las futuras manifestaciones clínicas que puedan presentar los pacientes con determinada taupatía.

Considerando las consecuencias funcionales de la reducción de tau observadas en esta tesis y los mecanismos de vulnerabilidad selectiva regional presentes en las taupatías (Fu et al., 2018; Forrest, et al., 2019), la hipótesis de esta investigación propuso demostrar que el silenciamiento de tau sitio-dirigido a regiones vulnerables a la acumulación patológica de esta proteína podría ser suficiente para revertir sus fenotipos asociados. Sin embargo, en un futuro, la estrategia de Tau-miRNAs dirigida a núcleos vulnerables requeriría del uso de los predictores mencionados para determinar cuáles son las regiones primariamente afectadas, con el fin de realizar el tratamiento y luego evaluar la evolución del proceso neurodegenerativo.

En las próximas décadas es esperable que los tratamientos dirigidos a tau u otras proteínas asociadas a enfermedades neurodegenerativas podrían no sólo contemplar mecanismos de vulnerabilidad selectiva regional, sino también celular. Por ejemplo, se podría inducir la expresión de estrategias de terapia génica únicamente en aquellas células que primariamente se encuentren comprometidas en la patología, como por ejemplo las neuronas piramidales de la corteza entorrinal en la EA (Fu et al., 2018, 2019). A partir de las evidencias obtenidas en el curso de esta tesis, se propone el refinamiento de la estrategia de Tau-miRNAs, enfocada en el silenciamiento de tau dirigido a subtipos neuronales vulnerables. El uso de esta nueva herramienta en modelos animales que expresen variantes patogénicas de tau de forma específica en ciertas regiones y/o tipos celulares relevantes para las taupatías (Harris et al., 2012; Liu

et al., 2012; Wegmann et al., 2019) permitirá evaluar si este tratamiento es suficiente para frenar el avance del proceso neurodegenerativo. Adicionalmente, un enfoque dirigido a ciertos tipos celulares permitirá principalmente elucidar los mecanismos de vulnerabilidad selectiva celular en las taupatías, los cuales dependen principalmente de la concentración de la proteína patológica, de sus propiedades de propagación, así como de la actividad de distintas vías de degradación celular (Fu et al., 2018). Asimismo, comprender cómo tau podría afectar diferencialmente la actividad eléctrica de distintos tipos neuronales (Chang, Evans, et al., 2021), dilucidar los mecanismos de neuroinflamación en los astrocitos y la microglía (Forrest, et al., 2019), y entender el rol en las taupatías primarias de ciertas células de la glía que presentan agregados de tau patológica (Forrest, et al., 2019; Götz et al., 2019) son desafíos que quedarán por resolver.

**Uso de microARNs artificiales y terapia génica para el tratamiento basado en la vulnerabilidad selectiva en enfermedades neurodegenerativas**

El uso de amiRNAs presenta una ventaja para estudiar los mecanismos de vulnerabilidad selectiva con respecto a un ARN o una proteína particular de interés, ya que su expresión se puede restringir a ciertas regiones o tipos celulares a través del uso de promotores de ARNPolII que sean específicos (Kotowska-Zimmer et al., 2021). Además, su expresión dirigida por el uso de vectores virales como los adenovirus asociados (AAVs) o lentivirus permite utilizar serotipos característicos que presenten cierto tropismo o mayor eficiencia de transducción en determinados tipos celulares. Para enfermedades asociadas al sistema nervioso central, los amiRNAs expresados a partir de vectores virales presentan la posibilidad de ser administrados mediante un sistema de inyecciones estereotáxicas intraparenquimales a diferencia del uso de punciones lumbares. Esto no sólo presentaría el beneficio de restringir su localización, sino también de poder dirigirse a estructuras afectadas que se encuentran lejanas a los ventrículos cerebrales, las cuales no serían alcanzadas por el tratamiento lumbar o requerirían de un mayor número de intervenciones para mantener un efecto sostenido en el tiempo (Evers et al., 2018; Miniarikova et al., 2018). Si bien la administración intracraneal parenquimal resulta invasiva, es destacable que, en tal caso, una única administración sería suficiente para el uso de esta terapia génica. La expresión estable de estos amiRNAs resultaría beneficiosa a largo plazo, particularmente en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, las cuales constituyen patologías crónicas en los pacientes que las padecen. La estrategia de amiRNAs mediante el uso de AAVs ha sido desarrollada para la enfermedad de Huntington (Evers et al., 2018; Spronck et al., 2019) y se encuentra en ensayos clínicos de fase I/II (NCT04120493 en ClinicalTrials.gov).

Diversos estudios en fase clínica han demostrado que inyecciones únicas de vectores virales son bien toleradas y demuestran beneficios clínicos en pacientes para diversas enfermedades neurológicas (Z. Zhao et al., 2022; Chancellor et al., 2023), incluyendo un estudio para la enfermedad de Parkinson a base de vectores lentivirales (Palfi et al., 2018). El uso de vectores lentivirales en esta tesis permitió restringir el tratamiento de los Tau-miRNAs a la corteza prefrontal, ya que estos permiten una expresión estable, a largo término y focalizada, limitando su propagación a otras regiones del cerebro. Adicionalmente, en esta investigación se ha utilizado una multiplicidad de infección relativamente baja (MOI≈5), para evitar la sobreexpresión de los Tau-miRNAs, evitando la saturación de la maquinaria de ARN de interferencia (ARNi) y los potenciales efectos adversos debidos a un silenciamiento pronunciado de tau. En futuras investigaciones, podría considerarse el uso de AAVs para la expresión de los amiRNAs, debido a que, a diferencia de los lentivirus, estos logran transducir las neuronas sin integrarse al genoma, presentando un método más seguro para su uso en pacientes.

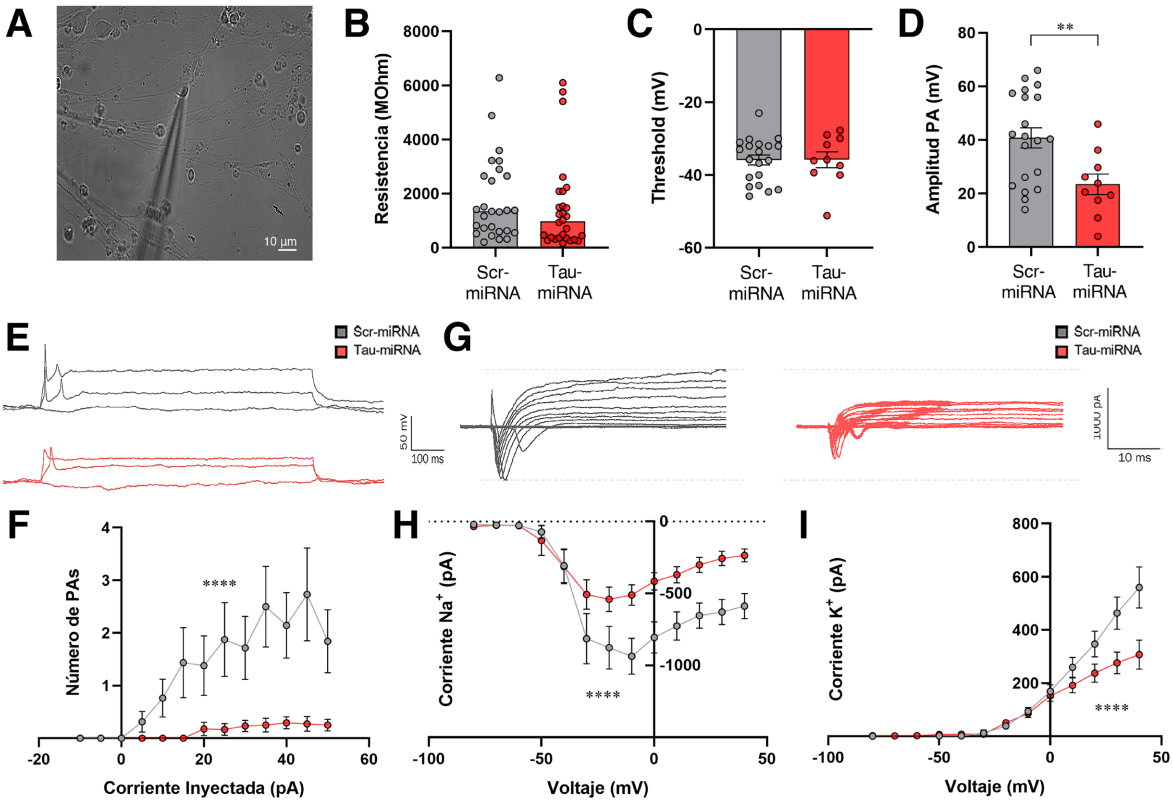
El uso de los amiRNAs representa una menor toxicidad en comparación con los shRNAs de primera generación, los cuales son expresados a través de promotores de ARNPolIII y por lo tanto se producen en elevadas dosis saturando la maquinaria de ARNi (Kotowska-Zimmer et al., 2021). Es por esto, que los amiRNAs representan una estrategia más segura, ya que los niveles de expresión de promotores de ARNPolII son menores y dependientes del tejido y/o tipo celular específico en comparación con los promotores ubicuos de ARNPolIII (Kotowska-Zimmer et al., 2021). En esta tesis se ha utilizado el promotor de sinapsina 1, lo que permitió restringir la expresión de los Tau-miRNAs exclusivamente a las neuronas. Sin embargo, para validar el uso clínico de esta herramienta será necesario realizar ensayos de seguridad con el fin de evaluar su toxicidad, como por ejemplo a través del análisis de *off-targets* por secuenciación de ARN (RNA-Seq), la detección de distintos marcadores de neuroinflamación, entre otros (Miniarikova et al., 2018). En conclusión, los amiRNAs presentan las siguientes ventajas: 1) son dirigidos de forma específica a determinadas regiones sin alterar el contenido del ARN mensajero blanco en otras áreas; 2) son expresados a partir de promotores de ARNPolII, por lo que su expresión puede ser específica de ciertos tejidos o tipos celulares; y 3) son procesados por la maquinaria celular endógena en un mecanismo mediado por DROSHA y DICER.

# CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral, se ha demostrado como prueba de concepto el uso de los Tau-miRNAs para silenciar la proteína tau a largo término en neuronas humanas diferenciadas y en el modelo murino de taupatía htau. El tratamiento sitio-dirigido de estas moléculas a la corteza prefrontal del ratón htau ha sido suficiente para disminuir los niveles de tau patológica y rescatar los fenotipos asociados a la disfunción de esta región vulnerable en el modelo. Esto ha sido demostrado a través de la prevención de los déficits en la captación de glucosa, la modulación de la actividad eléctrica neuronal y la reversión del deterioro cognitivo. En conjunto, estos resultados aportan sustento para el desarrollo de terapias génicas basadas en microARNs artificiales y su aplicación en taupatías, contemplando los mecanismos de vulnerabilidad selectiva presentes en estas patologías. Por otro lado, los ensayos realizados en neuronas humanas diferenciadas demuestran que, si bien el tratamiento con los Tau-miRNAs no genera cambios sustanciales en la morfología y el transporte axonal, es necesario tener en consideración las posibles consecuencias del silenciamiento generalizado de tau sobre la actividad eléctrica. En pacientes con taupatías, será necesario evaluar si los beneficios de los enfoques terapéuticos basados en la reducción de los niveles de tau prevalecen sobre los posibles efectos adversos a largo plazo.

En conjunto, los resultados presentados consolidan el potencial de los Tau-miRNAs como una herramienta terapéutica innovadora en el contexto de las taupatías, al integrar especificidad molecular, efectividad funcional y aplicabilidad en modelos relevantes. Si bien estos resultados obtenidos ofrecen una base prometedora, también subrayan la necesidad de continuar explorando los efectos del silenciamiento de tau en contextos celulares y circuitales más complejos, especialmente en humanos a través de ensayos clínicos. Esta tesis no solo aporta evidencia experimental valiosa, sino que, asimismo, invita a reflexionar sobre el diseño de estrategias terapéuticas que contemplen la biología particular de las regiones y poblaciones neuronales vulnerables. En base a los resultados de esta tesis, nuestro laboratorio se encuentra actualmente enfocado en el desarrollo de nuevas moléculas para enfoques terapéuticos refinados, basados en los principios de vulnerabilidad celular selectiva, con el objetivo de avanzar hacia intervenciones más precisas, seguras y personalizadas para el tratamiento de las taupatías.

# ANEXO 1




**Anexo 1. Análisis del efecto de los Tau-miRNAs sobre la actividad eléctrica de las neuronas humanas diferenciadas. A.** Imagen representativa de la configuración de *patch-clamp* en una neurona transducida con los miRNAs. **B.** Resistencia de entrada. Scr-miRNA n=27, Tau-miRNA n=28. **C-D.** Valores del *threshold* o umbral (**C**) y la amplitud del potencial de acción (PA) (**D**). Scr-miRNA n=20, Tau-miRNA n=10. **E-F.** Configuración de *current-clamp*. Registros representativos (**E**) y número de PAs (**F**) evocados a partir de pasos crecientes de corriente despolarizante. **G-I.** Configuración de *voltage-clamp*. Registros representativos (**G**) y valores promedio de las amplitudes (en picoamperes) de las corrientes de sodio (**H**) y potasio (**I**) obtenidas a partir de pasos crecientes de voltaje. Scr-miRNA n=21, Tau-miRNA n=17. Para el gráfico B, datos representados como puntos de dispersión con mediana; Mann-Whitney *U-test*. Para los gráficos C y D, datos representados como puntos de dispersión con promedio ± SEM; *t-test* paramétrico. Para los gráficos F, H e I, datos representados con promedio ± SEM, ANOVA de dos vías mostrando la diferencia entre grupos únicamente. ***p*<0,01, *****p*<0,0001.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Diseño de microARNs y empaquetado en vectores lentivirales

**Diseño de los microARNs artificiales contra tau.** Se diseñaron microARNs artificiales siguiendo una combinación de reglas descriptas dentro del laboratorio y un algoritmo de acceso libre del Whitehead Institute for Biomedical Research (MIT): http://sirna.wi.mit.edu. Se combinó el esqueleto endógeno del miRNA-155 (Fowler et al., 2015), conservando las secuencias flanqueantes nativas, con dos secuencias de siARN diseñadas para dirigirse al ARN mensajero de *MAPT*. Primero, se obtuvieron cinco secuencias de siARN combinando métodos de diseño publicados anteriormente (Pei y Tuschl, 2006; Tafer, 2014). En resumen, el consenso de secuencia de los dúplex fue N2[CG]N8[AUT]N8[AUT]N2, evitando secuencias repetidas sucesivas de 4 nt de la misma base, con un contenido de GC en la secuencia entre el 45% y el 50%. Se eligieron regiones blanco en la unión del exón 2/3 (exones alternativos) y en el exón 11 (exón constitutivo) para maximizar el silenciamiento. Los valores termodinámicos del dúplex fueron calculados según la energía en el extremo 5' de la cadena sentido (Es) y la energía en el extremo 5' de la cadena antisentido (Eas). Se seleccionaron únicamente aquellos con Eas < Es de valores de ΔT entre -5 y -3. Se obtuvieron cinco secuencias iniciales dirigidas al ARN mensajero de *MAPT*, de las cuales dos fueron seleccionadas después de realizar un BLAST contra el genoma humano y de ratón (se descartaron secuencias con un *off-target* mayor a 17 nt). Este tipo de selección permite reducir el efecto *off-target* de los microARNs (Fowler et al., 2015; Kotowska-Zimmer et al., 2021). La secuencia Scr se obtuvo con el mismo contenido de GC, con un emparejamiento de menos de 15 nt después del BLAST. Las secuencias seleccionadas de siARN se insertaron en un esqueleto de microARN que contiene los brazos del miRNA-155 seguidos de la secuencia antisentido, el lazo y la secuencia sentido. Desde la secuencia sentido del siARN, se eliminaron los nt 10 y 11 para permitir la formación de una estructura 3D que optimiza la unión con el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) (Pei y Tuschl, 2006).

Las secuencias completas de los microARNs artificiales que fueron utilizadas en este trabajo se describen abajo:

[microARN brazo 5' - Secuencia antisentido (21nt) - Loop - Secuencia sentido (19nt) - microARN brazo 3'].

***Tau-miRNA 166 (blanco unión exones 2/3):***
ACCGGTGTCGACTTTAAAGGGAGGTAGTGAGTGGACCAGTGGATCCTGGAGGCTT
GCTGAAGGCTGTATGCTGAATGCCTGCTTCTTCAGCTTTGTTTTGGCCACTGACTG

ACAAAGCTGAAAGCAGGCATTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGG
AACAAATGGCCCAGATCTGGCCGCACTCGAGATATCTAGAATTCACTAGTGAGCTC.

***Tau-miRNA 724 (blanco exón 11):***
ACCGGTGTCGACTTTAAAGGGAGGTAGTGAGTGGACCAGTGGATCCTGGAGGCTT
GCTGAAGGCTGTATGCTGTAATGAGCCACACTTGGAGGTGTTTTGGCCACTGACT
GACACCTCCAAGTGGCTCATTACAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGG
AACAAATGGCCCAGATCTGGCCGCACTCGAGATATCTAGAATTCACTAGTGAGCTC.

***Scr-miRNA:***
accggtGTCGACTTTAAAGGGAGGTAGTGAGTGGACCAGTGGATCCTGGAGGCTTG
CTGAAGGCTGTATGCTGAAATGTACTGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTG
ACGTCTCCACGCAGTACATTTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGA
ACAAATGGCCCAGATCTGGCCGCACTCGAGATATCTAGAATTCACTAGTGAGCTC.

**Vectores lentivirales.** Los microARNs artificiales fueron subclonados bajo el promotor de sinapsina 1, entre los sitios de restricción de AgeI y EcoRI dentro de un vector lentiviral utilizado anteriormente (Espíndola et al., 2018; Damianich et al., 2021). Las partículas lentivirales (LVs) fueron generadas de la siguiente manera: se crecieron células HEK-293FT en medio DMEM, suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 0,5 mM de L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 ug/ml de estreptomicina. Una vez que las células llegaron a un 80-85% de confluencia, se cotransfectaron con el vector lentiviral o *shuttle vector* (que podía contener al Tau-miRNA 166, Tau-miRNA 724 o Scr-miRNA) en conjunto con los vectores llamados *helpers* que codifican para las proteínas de empaquetado y de envoltura (CMV Δ8.9 y CMV-VSVg, respectivamente). Luego de 36 horas, se levantó el medio de cultivo con el fin de recolectar las LVs. Este medio fue tratado con DNAsa I, filtrado y ultracentrifugado a 100.000 x g para concentrar las LVs. El pellet obtenido fue resuspendido en PBS por 2 horas a 4°C y luego fue alicuotado y almacenado a -80°C para su posterior uso.

## 2. Experimentos en cultivo

***Screening* de los microARNs contra tau.** Se crecieron células SH-SY5Y en el medio de cultivo DMEM/F12, que fue suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 0,5 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomicina. Cuando las células alcanzaron un 80-85% de confluencia, las células fueron infectadas con distintas LVs a partir de las cuales se formaron los siguientes grupos experimentales: NI (células no infectadas), Scr-miRNA, Tau-miRNA 166, Tau-miRNA 724 y Tau-miRNAs (mezcla 1:1 de Tau-miRNA 166 y Tau-miRNA 724). Luego de 3 semanas postransducción, las células fueron procesadas para obtener extractos de proteína para hacer los ensayos bioquímicos correspondientes.

**Cultivo de hiPSCs y diferenciación neuronal.** Las neuronas se derivaron a partir de células pluripotentes humanas inducidas (hiPSCs) como se describió anteriormente (Bessone et al., 2022). Brevemente, los fibroblastos embrionarios murinos irradiados (MEFs) se sembraron en placas de Petri recubiertas con gelatina 24 horas antes de sembrar las hiPSCs y se mantuvieron en DMEM completo (DMEM de glucosa alta, 10% FBS, 1% Glutamax, 1% penicilina-estreptomicina). Las hiPSCs se cultivaron a 37°C, 95% de humedad y 5% de $CO_2$ en medio HES (KO DMEM, 20% de reemplazo de suero KO, 1% Glutamax, 1% de aminoácidos no esenciales, 0.1% de beta-mercaptoetanol, 4 ng/mL de bFGF) para permitir la formación de colonias. Cuando las colonias alcanzaron un tamaño óptimo, se transfirieron a una placa de Petri y luego de 12–18 horas, a frascos de 25 cm² y se cultivaron en suspensión para permitir la formación de cuerpos embrioides, los cuales fueron inducidos con medio de inducción neural (NIM; DMEM/F12, 1% suplemento N2, 1% de aminoácidos no esenciales, 280 UI/mL de heparina y 1% de penicilina-estreptomicina). Los cuerpos embrioides se transfirieron a placas de seis pocillos recubiertas con laminina para la formación de rosetas neuronales. Después de 7–14 días de crecimiento, las rosetas neuronales se recogieron y se transfirieron a frascos de 25 cm² y se mantuvieron en medio NIM completo (2% suplemento B27, 0.1% ácido ascórbico) durante 1 mes, cambiando el medio de cultivo cada 2 días. Las rosetas neuronales se recogieron y disociaron mediante un tratamiento de 8 minutos con acutasa y tripsina. La reacción se bloqueó con inhibidor de tripsina y la suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 1,000 rpm. El pellet se lavó con DMEM/F12, se disgregó a células únicas y se resuspendió en un medio de diferenciación neural (NDM; Neurobasal, 1% suplemento N2, 2% suplemento B27 y 1% de penicilina-estreptomicina). Aproximadamente $3\times10^4$ células se sembraron en cubreobjetos ubicados en placas de 24 pocillos y previamente recubiertos con 0.1 mg/mL de poliornitina y 20 µg/mL de laminina. Los cultivos neuronales se mantuvieron luego en 500 µL/pocillo de medio NDM completo (NDMc; laminina, cAMP, ácido ascórbico, 10 ng/mL de BDNF, 10 ng/mL de GDNF). Las neuronas sembradas se mantuvieron en cultivo, cambiando la mitad del medio cada 3 días. Inicialmente, se intentó una confluencia de aproximadamente el 40%, lo que permitiría que en el futuro se extiendan las proyecciones de las neuritas.

Para determinar la identidad neuronal, las neuronas fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 4% y sacarosa al 4% en PBS durante 30 minutos a 37°C en DIV14. Después de la fijación, las células fueron lavadas dos veces con PBS durante 10 minutos y permeabilizadas con 0.1% de Triton X-100 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas a temperatura ambiente durante 1

hora utilizando una solución bloqueadora que consistía en 3% de BSA, 0.1% de Triton X-100 y 10% de suero de cabra en PBS. Luego, las células fueron marcadas con anticuerpos primarios en la solución bloqueadora e incubadas ON a 4°C. Las células fueron enjuagadas en PBS y marcadas con anticuerpos secundarios a temperatura ambiente durante 2 horas, luego marcadas durante 30 minutos con DAPI y montadas en portaobjetos con MOWIOL. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anti-Nestina (1:200), anti βIII-tubulina (1:1,000), anti-p-tau (1:200) y anticuerpos secundarios contra IgG de ratón y conejo conjugados con Alexa Fluor 564 o Alexa Fluor 488 (1:500). Las células fijadas fueron observadas mediante un microscopio confocal invertido Zeiss LSM 780 utilizando un objetivo de inmersión en aceite (40×/0.55 NA). Todas las neuronas utilizadas en esta investigación mostraron diferenciación neuronal y polarización bien definida.

**Transducción y transfección de neuronas derivadas de hiPSCs.** En DIV14, las neuronas fueron transducidas con LVs que contenían los microARNs a una multiplicidad de infección (MOI) entre 5 y 10, como se describió previamente (Lacovich et al., 2017). Después de 12 horas, se les añadió 300 µL de medio NDMc fresco. 21 días después de la transducción con los LVs (en DIV35), las neuronas fueron transfectadas con 1 µg de pcDNA3-APP-YFP en una mezcla de transfección de OptiMEM y Lipofectamina 2000, como se describió anteriormente (Lacovich et al., 2017). 2 horas después de la transfección, se reemplazó el medio de cultivo y, 48 horas más tarde (en DIV37), las neuronas fueron analizadas mediante *live-cell imaging* para el análisis de transporte axonal, registros de *patch-clamp*, fijadas para el análisis de Scholl o procesadas para obtener ARN y proteína para RT-qPCR y Western blot, respectivamente. La transducción con las LVs fue confirmada por la expresión de la proteína fluorescente dsRed y la transfección del plásmido fue confirmada por la expresión de la proteína fluorescente de fusión APP-YFP. Las células fueron observadas con un microscopio confocal invertido Zeiss LSM 780 utilizando un objetivo de inmersión en aceite (40×/0.55 NA).

**Aislamiento de ARN de neuronas en cultivo y detección del ARN mensajero de tau total.** El ARN total se aisló de neuronas utilizando el kit AllPrep DNA/RNA mini (Qiagen) de cultivos de alta densidad en DIV37. Se realizó la transcripción reversa con 0,5 µg de ARN utilizando el kit TaqMan RT (Applied Biosystems) en un volumen total de 10 µl, con una relación equimolar de oligo (dT) y hexámeros aleatorios (*random hexamers* en inglés). Las condiciones de transcripción reversa fueron: 10 min a 25°C, 30 min a 48°C, y un paso final de 5 min a 95°C. Para realizar la cuantificación relativa de tau total mediante PCR cuantitativa, se utilizaron *primers* específicos para amplificar las seis

isoformas de los transcriptos de ARN mensajero de tau humana: 5'-AGCCAAGACATCCACACGTT-3' (*forward* E7) y 5'-ATCAGAGGGTCTGAGCTACCA-3' (*reverse* E8). Para la normalización, se detectó el ARN mensajero de *GAPDH* utilizando la siguiente secuencia de *primers*: 5'-GGTCTCCTCTGACTTCAACA-3' (*forward*) y 5'-GTGAGGGTCTCTCTCTTCCT-3' (*reverse*). Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron por triplicado utilizando 25 ng de cDNA y 5 µl de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en un volumen final de 10 µl. Se utilizó el termociclador de PCR en tiempo real MJ Research Opticon 2 con las siguientes condiciones de ciclado: luego de una desnaturalización inicial a 95°C (10 min), se realizaron 39 ciclos a 95°C (10 s), un *annealing* a 58°C (30 s) y la elongación a 72°C (45 s). Los datos fueron analizados con el software Opticon Monitor 3 (Biorad) para obtener el ΔCT por muestra. Los niveles de ARN mensajero de tau total fueron normalizados al gen de referencia *GAPDH*.

**Análisis de Scholl.** Se realizó un análisis de Scholl semiautomatizado utilizando la herramienta *Simple Neurite Tracer* (SNT) del complemento *Neuroanatomy* en ImageJ (Saez et al., 2020). Las neuronas fueron marcadas con MAP2 (1:300) utilizando el protocolo de fijación e inmunofluorescencia descripto anteriormente. Se utilizaron imágenes de 8 bits para determinar las dendritas y ramificaciones, las cuales fueron trazadas de manera semiautomática con el SNT. Después del trazado, el análisis de Scholl se realizó con la herramienta *Neuroanatomy*, donde se colocó una serie de anillos concéntricos consecutivos desde el soma, distribuidos uniformemente para cubrir la extensión de las proyecciones. El incremento del radio de los anillos se mantuvo constante para todas las imágenes. Cada proyección que intersectaba con un anillo fue contada de forma acumulativa. Como era esperado, se observó una distribución en picos en los anillos iniciales, lo que refleja una mayor arborización de las proyecciones cerca del cuerpo celular. A medida que los anillos se alejaban del centro del soma, el número de proyecciones que se intersectaban disminuía (Saez et al., 2020).

***Live-cell imaging* y análisis del transporte axonal.** El *live-cell imaging* y el análisis del transporte axonal a través de kimogramas se realizaron como se describió previamente (Bessone et al., 2022). Brevemente, se grabaron videos de 30 segundos de partículas móviles de APP-YFP en neuronas utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia (Olympus IX81) conectado a una cámara CCD (Olympus DP71/12.5 megapíxeles). Los cultivos se observaron bajo un objetivo de 100× (1.45 NA) y se mantuvieron a 37°C, 5% $CO_2$ y 10% de humedad utilizando una cámara húmeda de $CO_2$ y una plataforma calefaccionada. La direccionalidad de las partículas se determinó buscando axones fluorescentes. Para evitar introducir sesgos debido al gradiente de

concentración de tau en los axones, el análisis de *live-cell imaging* se realizó en la parte media de los axones, separados por al menos dos campos de visión (aproximadamente 200 µm) de los cuerpos celulares y de los extremos axonales. A partir de las grabaciones se generaron kimogramas utilizando ImageJ con el complemento *Multiple Kymograph*. Los kimogramas fueron graficados y se determinaron la direccionalidad y la densidad de las vesículas para su posterior análisis utilizando rutinas personalizadas en MATLAB (Bessone et al., 2022).

**Registros electrofisiológicos de neuronas en cultivo.** Para los registros electrofisiológicos, las neuronas derivadas de hiPSCs en cultivo fueron mantenidas en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF; mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2.3 $NaH_2PO_4$, 25 $NaHCO_3$, 2 $CaCl_2$, 1.3 $MgCl_2$, 1.3 $Na^+$-ascorbato, 3.1 $Na^+$-piruvato y 10 dextrosa (315 mOsm) con 95% $O_2$/5% $CO_2$. Los registros de *patch-clamp* se realizaron utilizando microelectrodos (6–10 MU) rellenos con (en mM): 120 gluconato de potasio, 4 $MgCl_2$, 10 tampón HEPES, 0.1 EGTA, 5 NaCl, 20 KCl, 4 ATP-tris, 0.3 GTP-tris y 10 fosfocreatina (pH 7.3; 290 mOsm). El registro de disparos fue evaluado manteniendo el potencial de membrana en reposo a -70 mV en modo *current-clamp,* con pasos sucesivos de corriente despolarizante de 10 pA de incremento y 500 ms de duración. Las corrientes dependientes de voltaje de $Na^+$ y $K^+$ fueron medidas en modo *voltage-clamp* utilizando un protocolo p/-6, detectando el pico rápido entrante para el $Na^+$ y el plateau tardío saliente para el $K^+$. La resistencia de entrada fue obtenida a partir de trazas de corriente evocadas por un paso de hiperpolarización de 10 mV. La resistencia en serie fue típicamente de 10–20 MU, y los experimentos fueron descartados si superaban los 50 MU. Los registros fueron obtenidos utilizando amplificadores Multiclamp 700B, digitalizados y adquiridos a 20 kHz en una computadora personal utilizando el software pClamp10.

**Detección y análisis del segmento inicial del axón (AIS).** Las células fueron fijadas y procesadas utilizando el mismo protocolo para verificar la calidad de las neuronas derivadas de hiPSCs. En este ensayo, las células fueron marcadas con el anticuerpo primario anti-anquirina-G (1:200) y con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 488 (1:500). Se evaluaron dos parámetros que describen la morfología del AIS: la longitud del AIS y la distancia al soma. Brevemente, la longitud del AIS se estimó midiendo la longitud de la tinción de anquirina G en axones individuales, y la distancia al soma se evaluó como la distancia desde el soma hasta el inicio de la tinción de anquirina G. Las imágenes fueron importadas en ImageJ y los píxeles se convirtieron en micrómetros para el análisis.

## 3. Experimentos en el modelo htau

**Ratones y diseño experimental.** Todos los procedimientos en los cuales se utilizaron ratones fueron diseñados de acuerdo con la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del *National Institutes of Health* (NIH). Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del INGEBI-CONICET y de la Universidad de Buenos Aires. Los ratones fueron habituados en condiciones estándar en ciclos de 12 hs de oscuridad/luz con acceso *ad libitum* a comida y agua. Los ratones htau transgénicos, con *background* genético C57BL/6, fueron obtenidos de *Jackson Laboratories* (B6.Cg-Map$^{ttm1(EGFP)Klt}$Tg (MAPT)8cPdav/J) y criados en el laboratorio. Los ratones htau portan un transgén *MAPT* humano en fondo *Mapt*$^{-/-}$ (tauKO). Los ratones fundadores htau se cruzaron con ratones C57BL/6 para obtener heterocigotas (F1). La F1 se cruzó para obtener las líneas htau y WT para experimentación, que se mantuvieron separadamente y se retrocruzaron cada 12-18 meses. Para determinar la presencia del transgén humano *MAPT* y el fondo *Mapt*$^{-/-}$ de ratón, todos los ratones utilizados fueron genotipados por PCR como se describió previamente (Andorfer et al., 2003; Avale et al., 2013). Los siguientes pares de *primers* se utilizaron para la detección del: gen *MAPT* humano (*forward*: 5'-ACTTTGAACCAGGATGGCTGAGCCC-3' y *reverse*: 5'-CTGTGCATGG CTGTCCCTACCTT-3'); el gen *Mapt* de ratón (*forward*: 5'-CTCAGCATC CCACCTGTAAC-3' y *reverse*: 5'-CCAGTTGTGTATGTCCACCC-3'); y el gen *Mapt* interrumpido o nulo (*forward*: 5'-CAGGCTTTGAACCAGTATGG-3' y *reverse*: 5'-TGAACTTGTGGC CGTTTACG-3').

Para los experimentos de caracterización de fenotipos en el modelo htau, se utilizaron cohortes de ratones htau y WT (machos y hembras) de 3, 6, 9 y 12 meses de edad para la batería de ensayos de conducta y microPET. Luego, para los registros electrofisiológicos de campo *in vivo* se utilizaron animales de 3, 6 y 12 meses de edad, mientras que para los ensayos de Western blot de tau insoluble y tau total sólo se analizaron animales de 3 y 6 meses. Para los experimentos del silenciamiento de tau por microARNs artificiales contra el ARN mensajero de *MAPT*, los grupos experimentales (cohortes htau y WT, machos y hembras) recibieron al azar la inyección con los Tau-miRNAs (166+724; 1:1) o Scr-miRNA en la corteza prefrontal medial. A su vez, las inyecciones fueron realizadas a distintas edades: una cohorte recibió la inyección a los 3 meses (tratamiento presintomático), mientras que otra cohorte la recibió a los 6 meses (tratamiento sintomático). Estas edades fueron elegidas según la aparición del *onset* fenotípico, determinado a partir de los resultados de la sección 2. Para ambos casos, de forma previa a la inyección se realizó una batería de ensayos de

comportamiento para determinar los fenotipos existentes antes del procedimiento. Luego se esperó a que los ratones tengan 12 meses de edad y se realizaron ensayos *in vivo* según corresponda: batería de comportamiento, microPET (sólo para el tratamiento a 3 meses) y registros electrofisiológicos de campo. Los ensayos bioquímicos *post-mortem* subsiguientes se indican a lo largo de los Materiales y Métodos. Para la extracción de proteína, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el área inyectada fue disecada y guardada a -80°C para su posterior uso. Para la técnica de *Array Tomography* seguida de inmunofluorescencia, los ratones recibieron una perfusión transcardíaca con paraformaldehído 4% (m/v) en 0,1M de PBS (pH 7.4).

**Inyecciones estereotáxicas.** Los ratones (machos y hembras) de alrededor de 8-10 semanas de edad para las inyecciones presintomáticas y de 22-26 semanas para las inyecciones sintomáticas (pesos: 25-35g) fueron anestesiados con isofluorano 0,5-2% (2% para la inducción/0,5-1% para la operación) junto con oxígeno en un flujo de 2,5 L/min y se colocaron en un marco estereotáxico. Con una jeringa Hamilton acoplada a una aguja de 36G, se inyectaron 1,5 ul de la suspensión lentiviral ($0,5x10^7$ TU/ml; 0,2 ul/min) por sitio de inyección. Las inyecciones se realizaron de forma bilateral, con 4 puntos en la corteza prefrontal medial, siguiendo las coordenadas del atlas de ratón (Paxinos and Franklin, 2012), en mm: AP=+2,3; LM=±0,5; DV=-1,8 y -2,2. La administración de analgésico sistémico (Meloxicam 5 mg/kg) fue la siguiente: una hora antes de la cirugía, 24 y 48 horas después. Previamente a la inyección se administró también un analgésico local (Lidocaína 0,5%, 5mg/kg). Ambos analgésicos fueron preparados en dextrosa 5% en PBS 0,1M (pH 7.4) para favorecer la recuperación. Además, de forma previa y después de las cirugías los animales fueron alimentados con alimento Nestum para una recuperación más rápida. Cualquier animal que presentaba signos de dolor o distrés luego de la cirugía fue inmediatamente sacrificado siguiendo el protocolo de punto final.

**Batería de ensayos de comportamiento.** Los experimentos se realizaron entre las 13:00 h y las 17:00 h bajo una iluminación tenue, en una sala de comportamiento separada, donde los ratones fueron transferidos con antelación. Los experimentos de comportamiento fueron analizados mediante el programa ANY-maze (*Stoelting Co.*). Todas las arenas y dispositivos fueron limpiados entre los sujetos experimentales para minimizar las señales de olor. El orden en el cual fueron realizados los ensayos fue el siguiente: 1) Laberinto en cruz elevado o *Elevated Plus Maze*, 2) Reconocimiento de objeto novedoso o *Novel Object Recognition* (NOR), 3) Campo abierto u *Open Field*. Se utilizó luz tenue para reducir los comportamientos ansiógenos en los ratones, y así poder evaluar fenotipos asociados a la desinhibición en los ensayos de Laberinto en cruz

elevado y Campo abierto, a partir del tiempo en los brazos abiertos o en el centro de la arena respectivamente para cada ensayo.

**Ensayo de Laberinto en cruz elevado.** El ensayo se realizó como se describió previamente (Espíndola et al., 2018). Brevemente, los ratones fueron colocados en el área central del laberinto (aparato elevado en forma de cruz de Perspex de 70 cm; brazos: 35×5 cm de ancho; cuadrado central: 5×5 cm, los brazos cerrados estaban rodeados por paredes verticales y los brazos abiertos con bordes sin protección). El tiempo transcurrido en los brazos abiertos y cerrados durante un período de exploración de 3 minutos fue registrado por una cámara aérea. Una entrada en un brazo se contabilizó solo si el centro del ratón estaba por dentro del brazo.

**Ensayo de Reconocimiento de objeto novedoso.** El ensayo se realizó como se describió previamente (Espíndola et al., 2018) con modificaciones menores. Los ratones fueron habituados individualmente a una arena vacía (30×23×25 cm) durante 10 minutos. Luego, se colocaron en la arena con dos objetos idénticos durante otros 10 minutos. 3 horas después, los ratones fueron evaluados durante 3 minutos en la misma arena con los dos objetos en la misma posición, pero uno de los objetos fue reemplazado por uno nuevo con forma, color y apariencia diferentes. Los objetos utilizados fueron similares a los que usaron en trabajos anteriores (Leger et al., 2013). Cada objeto fue asignado aleatoriamente como nuevo o familiar para cada ratón. Se registró el tiempo dedicado a explorar cada objeto, a partir de la entrada de la cabeza del animal dentro del área del objeto (distancia entre la nariz del ratón y el objeto menor a 2 cm). El índice de discriminación se calculó como el tiempo dedicado a explorar el objeto nuevo en relación con el tiempo total dedicado a explorar ambos objetos.

**Ensayo de Campo abierto.** Se utilizaron cajas de actividad (*Med Associates Inc.*) acopladas a una interfaz de computadora (*Software Activity Monitor*) para evaluar la actividad horizontal y vertical como se describió anteriormente (Espíndola et al., 2018). Los ratones fueron colocados en el centro de cajas de acrílico vacías (40×40×40 cm) y sus trayectorias fueron registradas durante 30 minutos mediante la interrupción de haces infrarrojos separados por 2,5 cm que cruzan el plano x–y en dos niveles del plano z para determinar la distancia total recorrida y el tiempo transcurrido en el centro (determinado como un cuadrado virtual de 10 $cm^2$).

**Tomografía de emisión de positrones (microPET).** Estos ensayos fueron realizados en el Centro de Imágenes Moleculares de FLENI (CIM-FLENI). La actividad cerebral *in vivo* fue analizada utilizando el análogo de glucosa (18F-FDG), que se localiza en los

tejidos metabólicamente activos y se acumula de manera dependiente de la actividad en los mismos. Los animales fueron ayunados durante 4 horas y luego inyectados con 25 mCi/gr de 18F-FDG por vía intraperitoneal, manteniéndolos sin perturbaciones en una jaula individual de temperatura controlada (29°C) durante 30 minutos para la incorporación del radiofármaco. Luego, los ratones fueron anestesiados usando una mezcla de isoflurano y $O_2$ (4.5% para inducción/1.5% para mantenimiento) y se mantuvieron en una mesa con temperatura controlada (35°C) durante la adquisición. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un PET preclínico TriFoil Lab-PET 4 (longitud axial de 3.75 cm) con una capa dual de cristales LYSO y GSO. La lectura de la señal se basó en un sistema de detección APD (*Avalanche PhotoDiode*). La reconstrucción de imágenes se realizó con datos de emisión mediante *Ordered-Subset Expectation Maximization* (3D-OSEM) en una reconstrucción iterativa (30 iteraciones). Todas las imágenes fueron registradas y normalizadas a una plantilla de 18F-FDG. La imagen cerebral cuantitativa de cada ratón fue normalizada a la corteza total para evitar sesgos en el análisis. La normalización de la intensidad fue considerada como una variable de regresión para cada factor utilizando la escala de promedios cerebrales totales (ANCOVA). Los resultados se muestran utilizando una escala de colores que representa una comparación estadística paramétrica entre los grupos, utilizando la prueba de *t-test* no pareada ($p<0.05$).

**Registros electrofisiológicos de campo *in vivo*.**

**Adquisición de datos.** Los electrodos para grabación extracelular se fabricaron como se describió previamente (Damianich et al., 2021). Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (2% para inducción/0.5%–1% para mantenimiento) y colocados en un marco estereotáxico. El cráneo fue expuesto para localizar claramente el bregma. Se realizó una craneotomía de la corteza prefrontal medial, siguiendo las coordenadas del atlas de ratón (Paxinos and Franklin, 2012), en mm: AP=+2.1, LM=±0.5, usando el bregma como referencia. Los tetrodos se bajaron dentro del cerebro a una velocidad de 10–20 mm/s. Se buscaron potenciales de acción espontáneos estables entre -1 y -2.5 mm en las coordenadas DV. Los datos electrofisiológicos fueron registrados en diferentes posiciones (se adquirieron hasta siete grabaciones por animal), con duraciones que variaron de 15 a 30 minutos cada una.

**Procesamiento y análisis de datos.** El análisis y las pruebas estadísticas se implementaron en MATLAB. Las señales brutas fueron filtradas en un rango de frecuencias entre 300 y 6000 Hz. La clasificación de los disparos se realizó como se detallará a continuación. Para detectar los eventos de disparo, se estableció un umbral automático ubicado 5 veces la desviación estándar sobre la media. Los disparos

detectados fueron divididos en varios grupos utilizando el método *k-means* y luego fueron combinados en función de la energía de interfaz de cada par. Los grupos fueron divididos y fusionados manualmente según sus componentes principales para el análisis subsecuente. Las unidades individuales fueron clasificadas en dos grupos en función del ancho promedio del pico o forma de onda, medido como el tiempo desde el valle hasta el siguiente pico del potencial de acción promedio (Figura 41). Las unidades con un valle al pico (eje *y* en la Figura 41A-B) mayor a 440 ms fueron consideradas como neuronas piramidales putativas (pPYR, en rojo) y el resto se consideraron interneuronas putativas (pINT, en azul). De esta forma, se distinguieron las neuronas según el promedio de su forma de disparo, independientemente de la tasa de disparos de cada una.

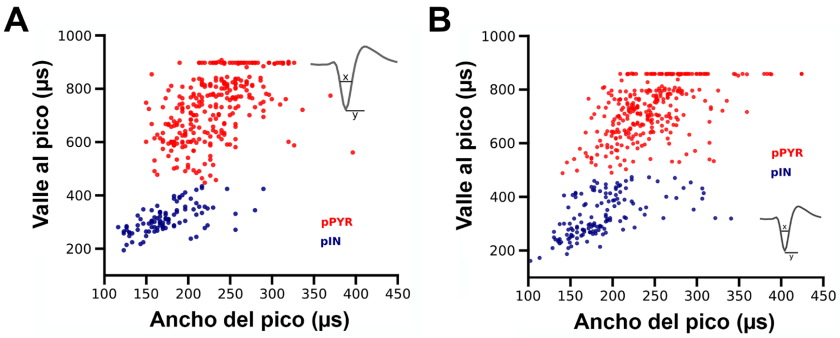



**Figura 41. Método de clasificación para las neuronas putativas piramidales e interneuronas en los registros electrofisiológicos de campo *in vivo* en ratones tratados con los Tau-miRNAs.** Para el promedio de la forma de disparo para cada neurona registrada, se graficó el valle al pico (*y*) y la amplitud a la mitad del disparo (*x*). Esto permitió separar a las formas de disparo en dos grupos, correspondiendo a las neuronas putativas piramidales (pPYR, puntos rojos) e interneuronas putativas (pINT, puntos azules). Sólo se consideraron aquellas neuronas registradas que presentaron una relación señal-ruido por encima de 5. Clasificación para los registros realizados para los grupos tratados con los Tau-miRNAs de forma temprana (**A**) y de forma tardía (**B**).

Se construyeron gráficos de *raster plot* a una resolución de 1 ms que contenían una secuencia de 0 (sin evento de pico) y 1 (evento de pico) para cada unidad aislada. Sobre estos gráficos, se calcularon la tasa de disparo (picos por segundo) y los ISI (intervalos entre picos) para cada neurona. Para medir el grado de *burstiness* (índice de actividad en ráfagas) de una neurona dada, se calculó un autocorrelograma con desplazamientos temporales que iban desde 0-50 o 0-400 ms a partir de los gráficos de *raster plot*. Luego, se determinó el desplazamiento temporal $\Delta t$ en el que se alcanzó la mitad del valor acumulado del autocorrelograma. El índice de actividad en ráfagas (*Burstiness Index*) se definió como: BI = (50 o 500 ms - $\Delta t$) / 50 o 500 ms (Csicsvari et. al, 1998).

***Array Tomography* seguido de inmunofluorescencia.** Después de la perfusión transcardíaca de los ratones, los cerebros fueron fijados en 4% de paraformaldehído

ON a 4°C, incubados en 15% de sacarosa durante 24 horas, e incubados en 30% de sacarosa por otras 24 horas. Los bloques de tejido que contenían la corteza prefrontal medial y la corteza insular agranular fueron cortados en secciones coronales de 300 µm de grosor utilizando un vibrátomo y luego procesados para *array tomography* como se describió previamente (Soiza-Reilly et al., 2019), utilizando la resina *LRWhite*. El tejido fue cortado con un cuchillo *Jumbo Histo Diamond* en un ultramicrótomo. Se recolectaron series de 20-30 secciones de 200 nm de grosor sobre cubreobjetos de vidrio y se procesaron para inmunofluorescencia. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-p-tau (AT180, fosforilación Thr231, 1:100) y anti-sinapsina1a (1:200). Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 488 y Alexa 647 (1:100). Las secciones se montaron sobre portaobjetos de vidrio con *SlowFade Gold Antifade* y luego se observaron en un microscopio de fluorescencia Leica DMR utilizando un objetivo PL APO 63× NA=1.32 con aceite y una cámara Retiga R1**.** Las imágenes seriales se alinearon y se convirtieron en *stacks* utilizando el programa ImageJ. Se utilizó una máscara de muestreo de 120×120 µm para el análisis cuantitativo utilizando la función *Analyze Particles*, obteniendo valores de botones sinápticos (para sinapsina) o de cúmulos de p-tau (para AT180) por $mm^3$.

**Extracción de proteínas y Western blot.** La proteína fue extraída tanto de células SH-SY5Y, neuronas humanas diferenciadas o a partir de las muestras de cerebro de ratón utilizando un buffer de extracción de proteínas que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM EGTA junto con inhibidor de proteasas y fosfatasas (100x). Luego de realizar una homogenización mecánica, los extractos proteicos fueron centrifugados a 13500 rpm por 15 minutos a 4°C.

Se separaron iguales cantidades de proteína (determinadas por el Kit Pierce de BCA) en geles de SDS-Poliacrilamida 10 o 12% (preparados con acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida al 30%) y se transfirieron utilizando un sistema de transferencia de tipo semiseco (*semi-dry*) a membranas de nitrocelulosa. Para determinar los pesos moleculares de las proteínas, se utilizó el marcador de proteínas *See Blue Plus 2*. Las membranas fueron bloqueadas por 1 hora en un buffer Tris-base conteniendo 5% (v/v) leche descremada y 0,05% (v/v) Tween 20. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-tau hiperfosforilada (PHF1, fosforilación de S396 y S404, 1:1000), anti-tau (1:10000) y anti-β-Actina (1:10000). Se incubaron las membranas ON a 4°C con los anticuerpos primarios en una mezcla de buffer Tris-base conteniendo 0,5% (v/v) leche descremada y 0,05% (v/v) Tween 20. Al otro día, se hicieron 3 lavados en buffer Tris-base conteniendo 0,05% (v/v) Tween 20 y luego las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón o conejo según corresponda (1:2000). Las

proteínas fueron visualizadas utilizando el reactivo ECL y fueron expuestas utilizando el equipo *GenegnomeXRQ*. La densidad óptica de las bandas fue cuantificada utilizando el software *FluorChem*.

**Ensayo de insolubilidad de sarkosyl para tau.** Este ensayo permite separar a partir de un extracto proteico la proteína que se encuentra solubilizada (en monómeros o incluso oligómeros) en el sobrenadante, de la proteína que se encuentra en agregados, la cual precipita en el pellet. Se utilizó un protocolo descripto anteriormente (Espíndola et al., 2018) con ciertas modificaciones. A partir de la proteína extraída de la corteza prefrontal, se separaron 250 ug de proteína total y se incubaron con 1% del reactivo de sarkosyl por 1 hora a temperatura ambiente en agitación mínima. Luego, este extracto de proteína fue ultracentrifugado a 39000 rpm por 1 hora a 20°C, manteniendo el 1% de concentración del reactivo de sarkosyl. El pellet obtenido fue lavado con buffer de extracción de proteínas conteniendo 1% de reactivo de sarkosyl mediante ultracentrifugación en las mismas condiciones de velocidad y temperatura anteriores, pero durante 15 minutos. El pellet final fue resuspendido en buffer O+ [62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 10% glicerol; 5% beta-mercaptoetanol; 2.3% SDS; 1 mM EGTA; 1 mM EDTA; inhibidor de proteasas y fosfatasas 100X; obtenido a partir de ciertas modificaciones de (Planel et al., 2009)] por 1 hora a temperatura ambiente en agitación máxima, para ser analizado por Western blot.

## 4. Análisis estadísticos

El análisis de datos se realizó con el software *GraphPad Prism*. Los conjuntos de datos de cada experimento fueron clasificados según el p valor obtenido para la prueba de Shapiro-Wilk. Si el conjunto de datos superó la prueba de normalidad ($p>0.05$) se clasificó como distribución normal. En cambio, al no superar dicha prueba ($p<0.05$), se clasificó como distribución no normal. Para los conjuntos de datos clasificados como distribución normal, las pruebas estadísticas utilizadas fueron: prueba de *t* de muestras independientes, prueba de *t* de muestras pareadas (particularmente para comparaciones antes y después del tratamiento sintomático), prueba de ANOVA de una vía, o prueba de ANOVA de dos vías. Para la prueba de ANOVA de una vía, se usaron las pruebas *post hoc*: prueba de Tukey o prueba de Dunnett. Cuando los conjuntos de datos tenían distribución no normal, las pruebas estadísticas utilizadas para comparar los grupos fueron las pruebas no paramétricas: prueba U de Mann-Whitney, prueba de Kruskall-Wallis o prueba Kolmogórov-Smirnov de dos muestras (para frecuencias acumuladas). Para la prueba de Kruskall-Wallis, se utilizó la prueba *post hoc* de Dunn.

# BIBLIOGRAFIA


Ahmed, T., Van der Jeugd, A., Blum, D., Galas, M. C., D'Hooge, R., Buee, L., & Balschun, D. (2014). Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion. *Neurobiology of Aging*, *35*(11), 2474–2478.

Ahmed, Z., Cooper, J., Murray, T. K., Garn, K., McNaughton, E., Clarke, H., Parhizkar, S., Ward, M. A., Cavallini, A., Jackson, S., Bose, S., Clavaguera, F., Tolnay, M., Lavenir, I., Goedert, M., Hutton, M. L., & O'Neill, M. J. (2014). A novel in vivo model of tau propagation with rapid and progressive neurofibrillary tangle pathology: The pattern of spread is determined by connectivity, not proximity. *Acta Neuropathologica*, *127*(5), 667–683.

Alldred, M. J., Duff, K. E., & Ginsberg, S. D. (2012). Microarray analysis of CA1 pyramidal neurons in a mouse model of tauopathy reveals progressive synaptic dysfunction. *Neurobiology of Disease*, *45*(2), 751–762.

Alonso, A. D. C., Mederlyova, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2004). Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(33), 34873–34881.

Alonso, A. D., Di Clerico, J., Li, B., Corbo, C. P., Alaniz, M. E., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2010). Phosphorylation of Tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined causes neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(40), 30851–30860.

Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., De Silva, R., Tucker, K. L., Barde, Y. A., Duff, K., & Davies, P. (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *Journal of Neurochemistry*, *86*(3), 582–590.

Andorfer, C., Acker, C. M., Kress, Y., Hof, P. R., Duff, K., & Davies, P. (2005). Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *Journal of Neuroscience*, *25*(22), 5446–5454.

Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Research Bulletin*, *126*, 238–292.

Avale, M. E., Rodríguez-Martín, T., & Gallo, J. M. (2013). Trans-splicing correction of tau isoform imbalance in a mouse model of tau mis-splicing. *Human Molecular Genetics*, *22*(13), 2603–2611.

Ballatore, C., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 8, Issue 9, pp. 663–672).

Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell* (Vol. 173, Issue 1, pp. 20–51).

Barthélemy, N. R., Fenaille, F., Hirtz, C., Sergeant, N., Schraen-Maschke, S., Vialaret, J., Buée, L., Gabelle, A., Junot, C., Lehmann, S., & Becher, F. (2016). Tau Protein Quantification in Human Cerebrospinal Fluid by Targeted Mass Spectrometry at High Sequence Coverage Provides Insights into Its Primary Structure Heterogeneity. *Journal of Proteome Research*, *15*(2), 667–676.

Barthélemy, N. R., Li, Y., Joseph-Mathurin, N., Gordon, B. A., Hassenstab, J., Benzinger, T. L. S., Buckles, V., Fagan, A. M., Perrin, R. J., Goate, A. M., Morris, J. C., Karch, C. M., Xiong, C., Allegri, R., Mendez, P. C., Berman, S. B., Ikeuchi, T., Mori, H., Shimada, H., … Xu, X. (2020). A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid and the evolution of stages of dominantly inherited Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, *26*(3), 398–407.

Bennett, C. F. (2019). Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annu. Rev. Med. 2019*, *70*, 307–321.

Bessone, I. F., Navarro, J., Martinez, E., Karmirian, K., Holubiec, M., Alloatti, M., Goto-Silva, L., Yepez, C. A., Martins-De-Souza, D., Nascimento, J. M., Bruno, L., Saez, T. M., Rehen, S. K., & Falzone, T. L. (2022). DYRK1A Regulates the Bidirectional Axonal Transport of APP in Human-Derived Neurons. *Journal of Neuroscience*, *42*(33), 6344–6358.

Bi, M., Gladbach, A., Van Eersel, J., Ittner, A., Przybyla, M., Van Hummel, A., Chua, S. W., Hoven, J. Van Der, Lee, W. S., Müller, J., Parmar, J., Jonquieres, G. Von, Stefen, H., Guccione, E., Fath, T., Housley, G. D., Klugmann, M., Ke, Y. D., & Ittner, L. M. (2017). Tau exacerbates excitotoxic brain damage in an animal model of stroke. *Nature Communications*, *8*(1).

Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica* (Vol. 82).

Braak, H., & Del Tredici, K. (2019). Top-Down Projections Direct the Gradual Progression of Alzheimer-Related Tau Pathology Throughout the Neocortex. En Takashima, A., Wolozin, B., & Buee, L., (Eds.), *Tau Biology* (pp. 291-304). Springer.

Buee, L. (2019). Dementia Therapy Targeting Tau. En Takashima, A., Wolozin, B., & Buee, L., (Eds.), *Tau Biology* (pp. 407-416). Springer.

Busche, M. A., Chen, X., Henning, H. A., Reichwald, J., Staufenbiel, M., Sakmann, B., & Konnerth, A. (2012). Critical role of soluble amyloid-β for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, *109*(22), 8740–8745.

Chancellor, D., Barrett, D., Nguyen-Jatkoe, L., Millington, S., & Eckhardt, F. (2023). The state of cell and gene therapy in 2023. *Molecular Therapy* (Vol. 31, Issue 12, pp. 3376–3388).

Chang, C. W., Evans, M. D., Yu, X., Yu, G. Q., & Mucke, L. (2021). Tau reduction affects excitatory and inhibitory neurons differently, reduces excitation/inhibition ratios, and counteracts network hypersynchrony. *Cell Reports*, *37*(3).

Chang, C. W., Shao, E., & Mucke, L. (2021). Tau: Enabler of diverse brain disorders and target of rapidly evolving therapeutic strategies. *Science* (Vol. 371, Issue 6532).

Chin, J., Palop, J. J., Yu, G. Q., Kojima, N., Masliah, E., & Mucke, L. (2004). Fyn kinase modulates synaptotoxicity, but not aberrant sprouting, in human amyloid precursor protein transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, *24*(19), 4692–4697.

Chin, J., Palop, J. J., Puoliväli, J., Massaro, C., Bien-Ly, N., Gerstein, H., Scearce-Levie, K., Masliah, E., & Mucke, L. (2005). Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, *25*(42), 9694–9703.

Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A. K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., & Tolnay, M. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nature Cell Biology*, *11*(7), 909–913.

Colin, M., Dujardin, S., Schraen-Maschke, S., Meno-Tetang, G., Duyckaerts, C., Courade, J. P., & Buée, L. (2019). From the prion-like propagation hypothesis to therapeutic strategies of anti-tau immunotherapy. *Acta Neuropathologica* (Vol. 139, Issue 1, pp. 3–25).

Colom-Cadena, M., Davies, C., Sirisi, S., Lee, J. E., Simzer, E. M., Tzioras, M., Querol-Vilaseca, M., Sánchez-Aced, É., Chang, Y. Y., Holt, K., McGeachan, R. I., Rose, J., Tulloch, J., Wilkins, L., Smith, C., Andrian, T., Belbin, O., Pujals, S., Horrocks, M. H., … Spires-Jones, T. L. (2023). Synaptic oligomeric tau in Alzheimer's disease — A potential culprit in the spread of tau pathology through the brain. *Neuron*, *111*(14), 2170-2183.e6.

Commins, S., & Kirby, B. P. (2019). The complexities of behavioural assessment in neurodegenerative disorders: A focus on Alzheimer's disease. *Pharmacological Research* (Vol. 147).

Crimins, J. L., Rocher, A. B., & Luebke, J. I. (2011). Electrophysiological changes precede morphological changes to frontal cortical pyramidal neurons in the rTg4510 mouse model of progressive tauopathy. *Acta Neuropathologica*, *124*(6), 777–795.

Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, Buzsáki G. (1998). Reliability and state dependence of pyramidal cell-interneuron synapses in the hippocampus: an ensemble approach in the behaving rat. *Neuron*, 21(1):179-89.

Damianich, A., Facal, C. L., Muñiz, J. A., Mininni, C., Soiza-Reilly, M., De León, M. P., Urrutia, L., Falasco, G., Ferrario, J. E., & Avale, M. E. (2021). Tau mis-splicing correlates with motor impairments and striatal dysfunction in a model of tauopathy. *Brain*, *144*(8), 2302–2309.

Danis, C., Dupré, E., Hanoulle, X., Landrieu, I., Lasorsa, A., Neves, J.F., Schneider, R., & Smet-Nocca, C. (2019). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Insights into Tau Structure in Solution: Impact of Post-translational Modifications. En Takashima, A., Wolozin, B., & Buee, L., (Eds.), *Tau Biology* (pp. 35-46). Springer.

Das, M., Maeda, S., Hu, B., Yu, G. Q., Guo, W., Lopez, I., Yu, X., Tai, C., Wang, X., & Mucke, L. (2018). Neuronal levels and sequence of tau modulate the power of brain rhythms. *Neurobiology of Disease*, *117*, 181–188.

Dawson, H. N., Cantillana, V., Chen, L., & Vitek, M. P. (2007). The tau N279K exon 10 splicing mutation recapitulates frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17 tauopathy in a mouse model. *Journal of Neuroscience*, *27*(34), 9155–9168.

De Wilde, M. C., Overk, C. R., Sijben, J. W., & Masliah, E. (2016). Meta-analysis of synaptic pathology in Alzheimer's disease reveals selective molecular vesicular machinery vulnerability. *Alzheimer's and Dementia*, *12*(6), 633–644.

Decker, J.M., & Mandelkow, E-M. (2019). Presynaptic Pathophysiology Encoded in Different Domains of Tau – Hyper-Versus Hypoexcitability? En Takashima, A., Wolozin, B., & Buee, L., (Eds.), *Tau Biology* (pp. 97-104). Springer.

Dekosky, S. T., & Scheff, S. W. (1990). Synapse Loss in Frontal Cortex Biopsies in Alzheimer's Disease: Correlation with Cognitive Severity. *Ann Neurol*, 27(5):457-64.

DeVos, S. L., Goncharoff, D. K., Chen, G., Kebodeaux, C. S., Yamada, K., Stewart, F. R., Schuler, D. R., Maloney, S. E., Wozniak, D. F., Rigo, F., Bennett, C. F., Cirrito, J. R., Holtzman, D. M., & Miller, T. M. (2013). Antisense reduction of tau in adult mice protects against seizures. *Journal of Neuroscience*, *33*(31), 12887–12897.

DeVos, S. L., Miller, R. L., Schoch, K. M., Holmes, B. B., Kebodeaux, C. S., Wegener, A. J., Chen, G., Shen, T., Tran, H., Nichols, B., Zanardi, T. A., Kordasiewicz, H. B., Swayze, E. E., Bennett, C. F., Diamond, M. I., & Miller, T. M. (2017). Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy. *Science Translational Medicine*, *9*(374).

Dickstein, D. L., Brautigam, H., Stockton, S. D., Schmeidler, J., & Hof, P. R. (2010). Changes in dendritic complexity and spine morphology in transgenic mice expressing human wild-type tau. *Brain Structure and Function*, *214*(2–3), 161–179.

Diener, C., Keller, A., & Meese, E. (2022). Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic. *Trends in Genetics* (Vol. 38, Issue 6, pp. 613–626).

Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E., & Holzbaur, E. L. F. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science*, *319*(5866), 1086–1089.

Drubin, D., Kobayashi, S., & Kirschner, M. (1986). Association of Tau Protein with Microtubules in Living Cells. *Ann NY Acad Sci*, 466:257-68.

Dudchenko, P. A. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *28*(7), 699–709.

Duff, K., Knight, H., Refolo, L. M., Sanders, S., Yu, X., Picciano, M., Malester, B., Hutton, M., Adamson, J., Goedert, M., Burki, K., & Davies, P. (2000). Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiology of Disease*, *7*(2), 87–98.

Dujardin, S., Bégard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Carrier, S., Lieger, S., Gonzalez, J. A., Deramecourt, V., Déglon, N., Maurage, C. A., Frosch, M. P., Hyman, B. T., Colin, M., & Buée, L. (2018). Different tau species lead to heterogeneous tau pathology propagation and misfolding. *Acta Neuropathologica Communications*, *6*(1), 132.

Dujardin, S., & Hyman, B.T. (2019). Tau Prion-Like Propagation: State of the Art and Current Challenges. En Takashima, A., Wolozin, B., & Buee, L., (Eds.), *Tau Biology* (pp. 305-326). Springer.

Dujardin, S., Commins, C., Lathuiliere, A., Beerepoot, P., Fernandes, A. R., Kamath, T. V., De Los Santos, M. B., Klickstein, N., Corjuc, D. L., Corjuc, B. T., Dooley, P. M., Viode, A., Oakley, D. H., Moore, B. D., Mullin, K., Jean-Gilles, D., Clark, R., Atchison, K., Moore, R., … Hyman, B. T. (2020). Tau molecular diversity contributes to clinical heterogeneity in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, *26*(8), 1256–1263.

Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (1998). Overexpression of Tau Protein Inhibits Kinesin-dependent Trafficking of Vesicles, Mitochondria, and Endoplasmic Reticulum: Implications for Alzheimer's Disease. *The Journal of Cell Biology* (Vol. 143, Issue 3).

Endepols, H., Anglada-Huguet, M., Mandelkow, E., Schmidt, Y., Krapf, P., Zlatopolskiy, B. D., Neumaier, B., Mandelkow, E. M., & Drzezga, A. (2022). Assessment of the In Vivo Relationship Between Cerebral Hypometabolism, Tau Deposition, TSPO Expression, and Synaptic Density in a Tauopathy Mouse Model: a Multi-tracer PET Study. *Molecular Neurobiology*, *59*(6), 3402–3413.

Espíndola, S. L., Damianich, A., Alvarez, R. J., Sartor, M., Belforte, J. E., Ferrario, J. E., Gallo, J. M., & Avale, M. E. (2018). Modulation of Tau Isoforms Imbalance Precludes Tau Pathology and Cognitive Decline in a Mouse Model of Tauopathy. *Cell Reports*, *23*(3), 709–715.

Evers, M. M., Miniarikova, J., Juhas, S., Vallès, A., Bohuslavova, B., Juhasova, J., Skalnikova, H. K., Vodicka, P., Valekova, I., Brouwers, C., Blits, B., Lubelski, J., Kovarova, H., Ellederova, Z., van Deventer, S. J., Petry, H., Motlik, J., & Konstantinova, P. (2018). AAV5-miHTT Gene Therapy Demonstrates Broad Distribution and Strong Human Mutant Huntingtin Lowering in a Huntington's Disease Minipig Model. *Molecular Therapy*, *26*(9), 2163–2177.

Forrest, S. L., Halliday, G. M., McCann, H., McGeachie, A. B., McGinley, C. V., Hodges, J. R., Piguet, O., Kwok, J. B., Spillantini, M. G., & Kril, J. J. (2019). Heritability in frontotemporal tauopathies. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*, *11*, 115–124.

Forrest, S. L., Kril, J. J., & Halliday, G. M. (2019). Cellular and regional vulnerability in frontotemporal tauopathies. *Acta Neuropathologica* (Vol. 138, Issue 5, pp. 705–727).

Fowler, D. K., Williams, C., Gerritsen, A. T., & Washbourne, P. (2015). Improved knockdown from artificial microRNAs in an enhanced miR-155 backbone: A designer's guide to potent multi-target RNAi. *Nucleic Acids Research*, *44*(5), e48.

Franzmeier, N., Neitzel, J., Rubinski, A., Smith, R., Strandberg, O., Ossenkoppele, R., Hansson, O., Ewers, M., Weiner, M., Aisen, P., Petersen, R., Jack, C. R., Jagust, W., Trojanowki, J. Q., Toga, A. W., Beckett, L., Green, R. C., Saykin, A. J., Morris, J. C., … Raj, B. A. (2020). Functional brain architecture is associated with the rate of tau accumulation in Alzheimer's disease. *Nature Communications*, *11*(1).

Franzmeier, N., Brendel, M., Beyer, L., Slemann, L., Kovacs, G. G., Arzberger, T., Kurz, C., Respondek, G., Lukic, M. J., Biel, D., Rubinski, A., Frontzkowski, L., Hummel, S., Müller, A., Finze, A., Palleis, C., Joseph, E., Weidinger, E., Katzdobler, S., … Ewers, M. (2022). Tau deposition patterns are associated with functional connectivity in primary tauopathies. *Nature Communications*, *13*(1).

Frey, B., Holzinger, D., Taylor, K., Ehrnhoefer, D. E., Striebinger, A., Biesinger, S., Gasparini, L., O'Neill, M. J., Wegner, F., Barghorn, S., Höglinger, G. U., & Heym, R. G. (2023). Tau seed amplification assay reveals relationship between seeding and pathological forms of tau in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathologica Communications*, *11*(1).

Fu, H., Rodriguez, G. A., Herman, M., Emrani, S., Nahmani, E., Barrett, G., Figueroa, H. Y., Goldberg, E., Hussaini, S. A., & Duff, K. E. (2017). Tau Pathology Induces Excitatory Neuron Loss, Grid Cell Dysfunction, and Spatial Memory Deficits Reminiscent of Early Alzheimer's Disease. *Neuron*, *93*(3), 533-541.e5.

Fu, H., Hardy, J., & Duff, K. E. (2018). Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, *21*(10), 1350–1358.

Fu, H., Possenti, A., Freer, R., Nakano, Y., Villegas, N. C. H., Tang, M., Cauhy, P. V. M., Lassus, B. A., Chen, S., Fowler, S. L., Figueroa, H. Y., Huey, E. D., Johnson, G. V. W., Vendruscolo, M., & Duff, K. E. (2019). A tau homeostasis signature is linked with the cellular and regional vulnerability of excitatory neurons to tau pathology. *Nature Neuroscience*, *22*(1), 47–56.

Fuster, J. M. (2015). Introduction. *The Prefrontal Cortex* (pp. 1–8).

Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., Jurado-Arjona, J., Avila, J., & Hernández, F. (2012). Tau protein and adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 1–6.

García-Cabrero, A. M., Guerrero-López, R., Giráldez, B. G., Llorens-Martín, M., Ávila, J., Serratosa, J. M., & Sánchez, M. P. (2013). Hyperexcitability and epileptic seizures in a model of frontotemporal dementia. *Neurobiology of Disease*, *58*, 200–208.

Gerson, J. E., & Kayed, R. (2013). Formation and propagation of tau oligomeric seeds. In *Frontiers in Neurology: Vol. 4.*

Gheyara, A. L., Ponnusamy, R., Djukic, B., Craft, R. J., Ho, K., Guo, W., Finucane, M. M., Sanchez, P. E., & Mucke, L. (2014). Tau reduction prevents disease in a mouse model of Dravet syndrome. *Annals of Neurology*, *76*(3), 443–456.

Gilley, J., Seereeram, A., Ando, K., Mosely, S., Andrews, S., Kerschensteiner, M., Misgeld, T., Brion, J. P., Anderton, B., Hanger, D. P., & Coleman, M. P. (2012). Age-dependent axonal transport and locomotor changes and tau hypophosphorylation in a “P301L” tau knockin mouse. *Neurobiology of Aging*, *33*(3), 621.e1-621.e15.

Goedert, M. (2015). Alzheimer’s and Parkinson’s diseases: The prion concept in relation to assembled Aβ, tau, and α-synuclein. *Science* (Vol. 349, Issue 6248).

Goedert, M., & Spillantini, M.G. (2019). Ordered Assembly of Tau Protein and Neurodegeneration. En Takashima, A., Wolozin, B., & Buee, L., (Eds.), *Tau Biology* (pp. 3-22). Springer.

Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R. C., Parisi, J. E., Hyman, B. T., & Neuronal, H. B. (1997). Neuronal Loss Correlates with but Exceeds Neurofibrillary Tangles in Alzheimer’s Disease. *Ann Neurol*, 41(1):17-24.

Götz, J.J. & Götz, J. (2019). Experimental Models of Tauopathy – From Mechanisms to Therapies. En Takashima, A., Wolozin, B., & Buee, L., (Eds.), *Tau Biology* (pp. 381-392). Springer.

Götz, J., Halliday, G., & Nisbet, R. M. (2019). Molecular Pathogenesis of the Tauopathies. *Annu Rev Pathol*, 14:239-261.

Grubb, M. S., & Burrone, J. (2010). Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature*, *465*(7301), 1070–1074.

Grubb, M. S., Shu, Y., Kuba, H., Rasband, M. N., Wimmer, V. C., & Bender, K. J. (2011). Short- and long-term plasticity at the axon initial segment. *Journal of Neuroscience*, *31*(45), 16049–16055.

Guo, T., Noble, W., & Hanger, D. P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathologica* (Vol. 133, Issue 5, pp. 665–704).

Harris, J. A., Koyama, A., Maeda, S., Ho, K., Devidze, N., Dubal, D. B., Yu, G. Q., Masliah, E., & Mucke, L. (2012). Human P301L-Mutant Tau Expression in Mouse Entorhinal-Hippocampal Network Causes Tau Aggregation and Presynaptic Pathology but No Cognitive Deficits. *PLoS ONE*, *7*(9).

Hasegawa, M. (2019). Structure of NFT: Biochemical Approach. En Takashima, A., Wolozin, B., & Buee, L., (Eds.), *Tau Biology* (pp. 23-34). Springer.

Hatch, R. J., Wei, Y., Xia, D., & Götz, J. (2017). Hyperphosphorylated tau causes reduced hippocampal CA1 excitability by relocating the axon initial segment. *Acta Neuropathologica*, *133*(5), 717–730.

Higuchi, M. (2019). Tau PET Imaging. En Takashima, A., Wolozin, B., & Buee, L., (Eds.), *Tau Biology* (pp. 217-230). Springer.

Holth, J. K., Bomben, V. C., Graham Reed, J., Inoue, T., Younkin, L., Younkin, S. G., Pautler, R. G., Botas, J., & Noebels, J. L. (2013). Tau loss attenuates neuronal network hyperexcitability in mouse and drosophila genetic models of epilepsy. *Journal of Neuroscience*, *33*(4), 1651–1659.

Hoover, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., Kotilinek, L. A., Grant, M. K., Pitstick, R., Carlson, G. A., Lanier, L. M., Yuan, L. L., Ashe, K. H., & Liao, D. (2010). Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration. *Neuron*, *68*(6), 1067–1081.

Hwang, K., Vaknalli, R. N., Addo-Osafo, K., Vicente, M., & Vossel, K. (2022). Tauopathy and Epilepsy Comorbidities and Underlying Mechanisms. *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 14).

Iba, M., Guo, J. L., McBride, J. D., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2013). Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of alzheimer's-like tauopathy. *Journal of Neuroscience*, *33*(3), 1024–1037.

Ittner, A., & Ittner, L. M. (2018). Dendritic Tau in Alzheimer's Disease. *Neuron* (Vol. 99, Issue 1, pp. 13–27).

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., & Götz, J. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-β toxicity in alzheimer's disease mouse models. *Cell*, *142*(3), 387–397.

Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J. L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K. P., Rowe, C. C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H. M., … Silverberg, N. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia* (Vol. 14, Issue 4, pp. 535–562).

Jafari, Z., Kolb, B. E., & Mohajerani, M. H. (2020). Neural oscillations and brain stimulation in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* (Vol. 194).

Jones, S. L., Korobova, F., & Svitkina, T. (2014). Axon initial segment cytoskeleton comprises a multiprotein submembranous coat containing sparse actin filaments. *Journal of Cell Biology*, *205*(1), 67–81.

Kimura, T., Whitcomb, D. J., Jo, J., Regan, P., Piers, T., Heo, S., Brown, C., Hashikawa, T., Murayama, M., Seok, H., Sotiropoulos, I., Kim, E., Collingridge, G. L., Takashima, A., & Cho, K. (2014). Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1633).

King, O. D., Gitler, A. D., & Shorter, J. (2012). The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. *Brain Research* (Vol. 1462, pp. 61–80).

Kopach, O., Esteras, N., Wray, S., Rusakov, D. A., & Abramov, A. Y. (2020). Maturation and phenotype of pathophysiological neuronal excitability of human cells in tau-related dementia. *J Cell Sci*, 133(10):jcs241687.

Kopeikina, K. J., Polydoro, M., Tai, H. C., Yaeger, E., Carlson, G. A., Pitstick, R., Hyman, B. T., & Spires-Jones, T. L. (2013). Synaptic alterations in the rTg4510 mouse model of tauopathy. *Journal of Comparative Neurology*, *521*(6), 1334–1353.

Kotowska-Zimmer, A., Pewinska, M., & Olejniczak, M. (2021). Artificial miRNAs as therapeutic tools: Challenges and opportunities. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 12, Issue 4).

Kuba, H., Oichi, Y., & Ohmori, H. (2010). Presynaptic activity regulates Na+ channel distribution at the axon initial segment. *Nature*, *465*(7301), 1075–1078.

Lacovich, V., Espindola, S. L., Alloatti, M., Devoto, V. P., Cromberg, L. E., Čarna, M. E., Forte, G., Gallo, J. M., Bruno, L., Stokin, X. B., Avale, M. E., & Falzone, T. L. (2017). Tau isoforms imbalance

impairs the axonal transport of the amyloid precursor protein in human neurons. *Journal of Neuroscience*, *37*(1), 58–69.

Lalonde, R., Dumont, M., Staufenbiel, M., & Strazielle, C. (2005). Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behavioural Brain Research*, *157*(1), 91–98.

Lane-Donovan, C., & Boxer, A. L. (2024). Disentangling tau: One protein, many therapeutic approaches. In *Neurotherapeutics* (Vol. 21, Issue 2).

Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Clos, A. L., Jackson, G. R., & Kayed, R. (2011). Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Molecular Neurodegeneration*, *6*(1).

Le Merre, P., Ährlund-Richter, S., & Carlén, M. (2021). The mouse prefrontal cortex: Unity in diversity. *Neuron* (Vol. 109, Issue 12, pp. 1925–1944).

Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, *8*(12), 2531–2537.

Leng, K., Li, E., Eser, R., Piergies, A., Sit, R., Tan, M., Neff, N., Li, S. H., Rodriguez, R. D., Suemoto, C. K., Leite, R. E. P., Ehrenberg, A. J., Pasqualucci, C. A., Seeley, W. W., Spina, S., Heinsen, H., Grinberg, L. T., & Kampmann, M. (2021). Molecular characterization of selectively vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, *24*(2), 276–287.

Leterrier, C., Potier, J., Caillol, G., Debarnot, C., Rueda Boroni, F., & Dargent, B. (2015). Nanoscale Architecture of the Axon Initial Segment Reveals an Organized and Robust Scaffold. *Cell Reports*, *13*(12), 2781–2793.

Li, X., Kumar, Y., Zempel, H., Mandelkow, E. M., Biernat, J., & Mandelkow, E. (2011). Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *EMBO Journal*, *30*(23), 4825–4837.

Liu, L., Drouet, V., Wu, J. W., Witter, M. P., Small, S. A., Clelland, C., & Duff, K. (2012). Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS ONE*, *7*(2).

Maeda, S., Djukic, B., Taneja, P., Yu, G., Lo, I., Davis, A., Craft, R., Guo, W., Wang, X., Kim, D., Ponnusamy, R., Gill, T. M., Masliah, E., & Mucke, L. (2016). Expression of A152T human tau causes age-dependent neuronal dysfunction and loss in transgenic mice. *EMBO Reports*, *17*(4), 530–551.

McInnes, J., Wierda, K., Snellinx, A., Bounti, L., Wang, Y. C., Stancu, I. C., Apóstolo, N., Gevaert, K., Dewachter, I., Spires-Jones, T. L., De Strooper, B., De Wit, J., Zhou, L., & Verstreken, P. (2018). Synaptogyrin-3 Mediates Presynaptic Dysfunction Induced by Tau. *Neuron*, *97*(4), 823-835.e8.

Mercuri, E., Darras, B. T., Chiriboga, C. A., Day, J. W., Campbell, C., Connolly, A. M., Iannaccone, S. T., Kirschner, J., Kuntz, N. L., Saito, K., Shieh, P. B., Tulinius, M., Mazzone, E. S., Montes, J., Bishop, K. M., Yang, Q., Foster, R., Gheuens, S., Bennett, C. F., … Finkel, R. S. (2018). Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine*, *378*(7), 625–635.

Miniarikova, J., Evers, M. M., & Konstantinova, P. (2018). Translation of MicroRNA-Based Huntingtin-Lowering Therapies from Preclinical Studies to the Clinic. *Molecular Therapy* (Vol. 26, Issue 4, pp. 947–962).

Minkeviciene, R., Rheims, S., Dobszay, M. B., Zilberter, M., Hartikainen, J., Fülöp, L., Penke, B., Zilberter, Y., Harkany, T., Pitkänen, A., & Tanila, H. (2009). Amyloid β-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *Journal of Neuroscience*, *29*(11), 3453–3462.

Morici, J. F., Bekinschtein, P., & Weisstaub, N. V. (2015). Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. *Behavioural Brain Research* (Vol. 292, pp. 241–251).

Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., & Mucke, L. (2011). The Many Faces of Tau. *Neuron* (Vol. 70, Issue 3, pp. 410–426).

Mummery, C. J., Börjesson-Hanson, A., Blackburn, D. J., Vijverberg, E. G. B., De Deyn, P. P., Ducharme, S., Jonsson, M., Schneider, A., Rinne, J. O., Ludolph, A. C., Bodenschatz, R., Kordasiewicz, H., Swayze, E. E., Fitzsimmons, B., Mignon, L., Moore, K. M., Yun, C., Baumann, T., Li, D., … Lane, R. M. (2023). Tau-targeting antisense oligonucleotide MAPTRx in mild Alzheimer's disease: a phase 1b, randomized, placebo-controlled trial. *Nature Medicine*, *29*(6), 1437–1447.

Muñiz, J. A., Facal, C. L., Urrutia, L., Clerici-Delville, R., Damianich, A., Ferrario, J. E., Falasco, G., & Avale, M. E. (2022). SMaRT modulation of tau isoforms rescues cognitive and motor impairments in a preclinical model of tauopathy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*.

Ozdemir, R. A., Tadayon, E., Boucher, P., Momi, D., Karakhanyan, K. A., Fox, M. D., Halko, M. A., Pascual-Leone, A., Shafi, M. M., & Santarnecchi, E. (2020). Individualized perturbation of the human connectome reveals reproducible biomarkers of network dynamics relevant to cognition. *Proc Natl Acad Sci USA*,117(14):8115-8125.

Palfi, S., Gurruchaga, J. M., Lepetit, H., Howard, K., Ralph, G. S., Mason, S., Gouello, G., Domenech, P., Buttery, P. C., Hantraye, P., Tuckwell, N. J., Barker, R. A., & Mitrophanous, K. A. (2018). Long-Term Follow-Up of a Phase I/II Study of ProSavin, a Lentiviral Vector Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Human Gene Therapy Clinical Development*, *29*(3), 148–155.

Palop, J. J., & Mucke, L. (2010). Amyloid-B-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: From synapses toward neural networks. In *Nature Neuroscience* (Vol. 13, Issue 7, pp. 812–818).

Paxinos, G. & Franklin K. B. J. (2012). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Elsevier.

Pei, Y., & Tuschl, T. (2006). On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nature Methods*, *3*(9), 670–676.

Planel, E., Bretteville, A., Liu, L., Virag, L., Du, A. L., Yu, W. H., Dickson, D. W., Whittington, R. A., & Duff, K. E. (2009). Acceleration and persistence of neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy following anesthesia. *The FASEB Journal*, *23*(8), 2595–2604.

Polydoro, M., Acker, C. M., Duff, K., Castillo, P. E., & Davies, P. (2009). Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of Tau pathology. *Journal of Neuroscience*, *29*(34), 10741–10749.

Pooler, A. M., Phillips, E. C., Lau, D. H. W., Noble, W., & Hanger, D. P. (2013). Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Reports*, *14*(4), 389–394.

Qiang, L., Sun, X., Austin, T. O., Muralidharan, H., Jean, D. C., Liu, M., Yu, W., & Baas, P. W. (2018). Tau Does Not Stabilize Axonal Microtubules but Rather Enables Them to Have Long Labile Domains. *Current Biology*, *28*(13), 2181-2189.e4.

Rabinovici, G. D., & Miller, B. L. (2010). Frontotemporal Lobar Degeneration Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis and Management. *CNS Drugs*, 24(5):375-98.

Roberson, E. D., Scearce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G. Q., & Mucke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*, *316*(5825), 750–754.

Saez, T. M. M., Bessone, I. F., Rodriguez, M. S., Alloatti, M., Otero, M. G., Cromberg, L. E., Pozo Devoto, V. M., Oubiñã, G., Sosa, L., Buffone, M. G., Gelman, D. M., & Falzone, T. L. (2020). Kinesin-1-mediated axonal transport of CB1 receptors is required for cannabinoid-dependent axonal growth and guidance. *Development (Cambridge)*, *147*(8).

Saito, T., Mihira, N., Matsuba, Y., Sasaguri, H., Hashimoto, S., Narasimhan, S., Zhang, B., Murayama, S., Higuchi, M., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., & Saido, T. C. (2019). Humanization of the entire murine Mapt gene provides a murine model of pathological human tau propagation. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(34), 12754–12765.

Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., Deture, M., Ramsden, M., Mcgowan, E., Forster, C., Yue, M., Orne, J., Janus, C., Mariash, A.,

Kuskowski, M., Hyman, B., Hutton, M., & Ashe, K. H. (2005). Tau Suppression in a Neurodegenerative Mouse Model Improves Memory Function. *Science*, 309(5733):476-81.

Shaw, L. M., Arias, J., Blennow, K., Galasko, D., Molinuevo, J. L., Salloway, S., Schindler, S., Carrillo, M. C., Hendrix, J. A., Ross, A., Illes, J., Ramus, C., & Fifer, S. (2018). Appropriate use criteria for lumbar puncture and cerebrospinal fluid testing in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia* (Vol. 14, Issue 11, pp. 1505–1521).

Sohn, P. D., Tracy, T. E., Son, H. I., Zhou, Y., Leite, R. E. P., Miller, B. L., Seeley, W. W., Grinberg, L. T., & Gan, L. (2016). Acetylated tau destabilizes the cytoskeleton in the axon initial segment and is mislocalized to the somatodendritic compartment. *Molecular Neurodegeneration*, *11*(1).

Sohn, P. D., Huang, C. T. L., Yan, R., Fan, L., Tracy, T. E., Camargo, C. M., Montgomery, K. M., Arhar, T., Mok, S. A., Freilich, R., Baik, J., He, M., Gong, S., Roberson, E. D., Karch, C. M., Gestwicki, J. E., Xu, K., Kosik, K. S., & Gan, L. (2019). Pathogenic Tau Impairs Axon Initial Segment Plasticity and Excitability Homeostasis. *Neuron*, *104*(3), 458-470.e5.

Soiza-Reilly, M., Meye, F. J., Olusakin, J., Telley, L., Petit, E., Chen, X., Mameli, M., Jabaudon, D., Sze, J. Y., & Gaspar, P. (2019). SSRIs target prefrontal to raphe circuits during development modulating synaptic connectivity and emotional behavior. *Molecular Psychiatry*, *24*(5), 726–745.

Spronck, E. A., Brouwers, C. C., Vallès, A., de Haan, M., Petry, H., van Deventer, S. J., Konstantinova, P., & Evers, M. M. (2019). AAV5-miHTT Gene Therapy Demonstrates Sustained Huntingtin Lowering and Functional Improvement in Huntington Disease Mouse Models. *Molecular Therapy Methods and Clinical Development*, *13*, 334–343.

Stefanoska, K., Gajwani, M., Tan, A. R. P., Ahel, H. I., Asih, P. R., Volkerling, A., Poljak, A., & Ittner, A. (2022). Alzheimer's disease: Ablating single master site abolishes tau hyperphosphorylation. *Sci. Adv* (Vol. 8).

Tafer, H. (2014). Bioinformatics of siRNA design. *Methods in Molecular Biology*, *1097*, 477–490.

Tai, C., Chang, C. W., Yu, G. Q., Lopez, I., Yu, X., Wang, X., Guo, W., & Mucke, L. (2020). Tau Reduction Prevents Key Features of Autism in Mouse Models. *Neuron*, *106*(3), 421-437.e11.

Tai, H. C., Serrano-Pozo, A., Hashimoto, T., Frosch, M. P., Spires-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (2012). The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *American Journal of Pathology*, *181*(4), 1426–1435.

Tai, H. C., Wang, B. Y., Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Spires-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (2014). Frequent and symmetric deposition of misfolded tau oligomers within presynaptic and postsynaptic terminals in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, *2*(1).

Takeda, S., Wegmann, S., Cho, H., Devos, S. L., Commins, C., Roe, A. D., Nicholls, S. B., Carlson, G. A., Pitstick, R., Nobuhara, C. K., Costantino, I., Frosch, M. P., Muller, D. J., Irimia, D., & Hyman, B. T. (2015). Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer's disease brain. *Nature Communications*, *6*.

Tăuţan, A. M., Casula, E. P., Pellicciari, M. C., Borghi, I., Maiella, M., Bonni, S., Minei, M., Assogna, M., Palmisano, A., Smeralda, C., Romanella, S. M., Ionescu, B., Koch, G., & Santarnecchi, E. (2023). TMS-EEG perturbation biomarkers for Alzheimer's disease patients' classification. *Scientific Reports*, *13*(1).

Tennant, J. M., Henderson, D. M., Wisniewski, T. M., & Hoover, E. A. (2020). RT-QuIC detection of tauopathies using full-length tau substrates. *Prion*, *14*(1), 249–256.

Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., Deteresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., & Katzman, R. (1991). Physical Basis of Cognitive Alterations in Alzheimer's Disease: Synapse Loss Is the Major Correlate of Cognitive Impairment. *Ann Neurol*, 30(4):572-80.

Teune, L. K., Bartels, A. L., De Jong, B. M., Willemsen, A. T. M., Eshuis, S. A., De Vries, J. J., Van Oostrom, J. C. H., & Leenders, K. L. (2010). Typical cerebral metabolic patterns in neurodegenerative brain diseases. *Movement Disorders*, *25*(14), 2395–2404.

Thom, M., Liu, J. Y. W., Thompson, P., Phadke, R., Narkiewicz, M., Martinian, L., Marsdon, D., Koepp, M., Caboclo, L., Catarino, C. B., & Sisodiya, S. M. (2011). Neurofibrillary tangle pathology and Braak staging in chronic epilepsy in relation to traumatic brain injury and hippocampal sclerosis: A post-mortem study. *Brain*, *134*(10), 2969–2981.

Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (1995). Domains of Tau Protein, Differential Phosphorylation, and Dynamic Instability of Microtubules. *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 6).

Tucker KL, Meyer M, & Barde YA. (2001). Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci*, 4(1):29-37.

Uversky, V. N. (2015). Intrinsically disordered proteins and their (disordered) proteomes in neurodegenerative disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7:18.

Vogel, P., Hahn, J., Duvarci, S., & Sigurdsson, T. (2022). Prefrontal pyramidal neurons are critical for all phases of working memory. *Cell Reports*, *39*(2).

Vossel KA, Zhang K, Brodbeck J, Daub AC, Sharma P, Finkbeiner S, Cui B, & Mucke L. (2010). Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport. *Science*, 330(6001):198.

Vossel, K. A., Xu, J. C., Fomenko, V., Miyamoto, T., Suberbielle, E., Knox, J. A., Ho, K., Kim, D. H., Yu, G. Q., & Mucke, L. (2015). Tau reduction prevents Aβ-induced axonal transport deficits by blocking activation of GSK3β. *Journal of Cell Biology*, *209*(3), 419–433.

Vossel, K. A., Tartaglia, M. C., Nygaard, H. B., Zeman, A. Z., & Miller, B. L. (2017). Epileptic activity in Alzheimer's disease: causes and clinical relevance. *The Lancet Neurology* (Vol. 16, Issue 4, pp. 311–322).

Wegmann, S., Eftekharzadeh, B., Tepper, K., Zoltowska, K. M., Bennett, R. E., Dujardin, S., Laskowski, P. R., MacKenzie, D., Kamath, T., Commins, C., Vanderburg, C., Roe, A. D., Fan, Z., Molliex, A. M., Hernandez-Vega, A., Muller, D., Hyman, A. A., Mandelkow, E., Taylor, J. P., & Hyman, B. T. (2018). Tau protein liquid–liquid phase separation can initiate tau aggregation. *The EMBO Journal*, *37*(7).

Wegmann, S., Bennett, R. E., Delorme, L., Robbins, A. B., Hu, M., Mckenzie, D., Kirk, M. J., Schiantarelli, J., Tunio, N., Amaral, A. C., Fan, Z., Nicholls, S., Hudry, E., & Hyman, B. T. (2019). Experimental evidence for the age dependence of tau protein spread in the brain. *Sci. Adv* (Vol. 5).

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S.-Y., & Kirschner, M. W. (1975). A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, *72*(5):1858-62.

Wheeler, J. M., McMillan, P. J., Hawk, M., Iba, M., Robinson, L., Xu, G. J., Dombroski, B. A., Jeong, D., Dichter, M. A., Juul, H., Loomis, E., Raskind, M., Leverenz, J. B., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., Schellenberg, G. D., & Kraemer, B. C. (2015). High copy wildtype human 1N4R tau expression promotes early pathological tauopathy accompanied by cognitive deficits without progressive neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathologica Communications*, *3*, 33.

Wu, J. W., Hussaini, S. A., Bastille, I. M., Rodriguez, G. A., Mrejeru, A., Rilett, K., Sanders, D. W., Cook, C., Fu, H., Boonen, R. A. C. M., Herman, M., Nahmani, E., Emrani, S., Figueroa, Y. H., Diamond, M. I., Clelland, C. L., Wray, S., & Duff, K. E. (2016). Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. *Nature Neuroscience*, *19*(8), 1085–1092.

Yamada, K., Cirrito, J. R., Stewart, F. R., Jiang, H., Finn, M. B., Holmes, B. B., Binder, L. I., Mandelkow, E. M., Diamond, M. I., Lee, V. M. Y., & Holtzman, D. M. (2011). In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, *31*(37), 13110–13117.

Yamada, K., Holth, J. K., Liao, F., Stewart, F. R., Mahan, T. E., Jiang, H., Cirrito, J. R., Patel, T. K., Hochgräfe, K., Mandelkow, E. M., & Holtzman, D. M. (2014). Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, *211*(3), 387–393.

Yizhar, O., & Levy, D. R. (2021). The social dilemma: prefrontal control of mammalian sociability. *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 68, pp. 67–75).

Yuan, A., Kumar, A., Peterhoff, C., Duff, K., & Nixon, R. A. (2008). Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *Journal of Neuroscience*, *28*(7), 1682–1687.

Zempel, H., & Mandelkow, E. (2014). Lost after translation: Missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease. *Trends in Neurosciences* (Vol. 37, Issue 12, pp. 721–732).

Zempel, H., Dennissen, F. J. A., Kumar, Y., Luedtke, J., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2017). Axodendritic sorting and pathological missorting of Tau are isoform-specific and determined by axon initial segment architecture. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(29), 12192–12207.

Zhao, X., Kotilinek, L. A., Smith, B., Hlynialuk, C., Zahs, K., Ramsden, M., Cleary, J., & Ashe, K. H. (2016). Caspase-2 cleavage of tau reversibly impairs memory. *Nature Medicine*, *22*(11), 1268–1276.

Zhao, Z., Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2022). Viral vector-based gene therapies in the clinic. *Bioengineering and Translational Medicine* (Vol. 7, Issue 1).

Zhou, L., McInnes, J., Wierda, K., Holt, M., Herrmann, A. G., Jackson, R. J., Wang, Y. C., Swerts, J., Beyens, J., Miskiewicz, K., Vilain, S., Dewachter, I., Moechars, D., Strooper, B. De, Spires-Jones, T. L., Wit, J. De, & Verstreken, P. (2017). Tau association with synaptic vesicles causes presynaptic dysfunction. *Nature Communications*, *8*.

Zollino, M., Orteschi, D., Murdolo, M., Lattante, S., Battaglia, D., Stefanini, C., Mercuri, E., Chiurazzi, P., Neri, G., & Marangi, G. (2012). Mutations in KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome phenotype. *Nature Genetics*, *44*(6), 636–638.