

MODELS MURINS PER A L'ESTUDI DE MALALTIES NEURODEGENERATIVES



Figura 1. Embrions de ratolí.

Escrit per:

Ignasi Sahún Abizanda

CRG, PRBB, Barcelona

Les malalties neurodegeneratives han estat probablement, durant molts anys, un dels reptes més importants de la patologia neurològica. Totes elles tenen en comú el seu curs progressiu i irreversible i, tanmateix, difereixen en les seves manifestacions clíniques, com per exemple en la demència precoç de la malaltia d'Alzheimer (Krigman i col., 1965), les alteracions motores de la malaltia de Parkinson (Effron, 1951) o l'atròfia muscular de l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA, Friedman i Freedman, 1950). Un dels abordatges experimentals més recents i que s'ha revelat com una forma excel·lent d'enfocar l'estudi de les causes i els mecanismes d'aquest tipus de malalties són els models murins genèticament modificats. Aquests models permeten realitzar aproximacions experimentals a l'etiologia de diverses malalties humanes a causa de la seva conservació filogenètica i l'homologia relativa amb el model humà. Però probablement

un dels motius més sòlids per a justificar el seu ús és l'auge en els darrers anys de l'aplicació de tècniques com l'enginyeria genètica, que permeten fabricar literalment models modificats genèticament a la carta. Tot i que aquestes modificacions genètiques podrien aplicar-se a les rates i fins i tot a mamífers superiors, se solen utilitzar ratolins per aquest tipus d'abordatge amb l'argument principal del millor coneixement del seu genoma, la seva facilitat de reproducció (Figura 1) i la seva mida, que permet la seva estabulació en grans grups. A això se li afegeix el fet que el seu metabolisme és ràpid i el seu cicle vital és de dos anys, cosa que permet fer estudis longitudinals en espais de temps relativament curts.

En concret, en l'estudi de les malalties neurodegeneratives s'han utilitzat diversos tipus de ratolins modificats genètica-

ment. D'una banda hi ha els models murins generats per transgènesi, amb sobreexpressió o silenciament d'un gen específic, models produïts per la supressió d'un tipus cel·lular determinat, mitjançant la incorporació de material genètic humà o de grans fragments de DNA mitjançant l'ús de cromosomes artificials de llevat (YACs) o bacterians (BACs). També hi ha models murins amb mutacions espontànies o induïdes per encreuaments selectius, models generats *in vitro* mitjançant la manipulació de cèl·lules pluripotencials i, potser els més interessants, models de transgènesi condicional. Mitjançant aquestes tècniques obtenim ratolins que sobreexpressen un gen o un grup de gens (models de sobreexpressió), que els tenen silenciats (models *knock-out*) o que només tenen afectat un al·lel (models heterozigots), o bé que simplement contenen mutacions en un o diversos gens concrets que seran responsables del fenotip observat.

Actualment hi ha un gran nombre de ratolins mutants utilitzats com a models experimentals per a l'estudi de les malalties neurodegeneratives. L'etiologia de la malaltia d'Alzheimer rau en la formació de plaques senils en què s'acumula la proteïna β -amiloide després d'un processament anormal de la mateixa (Mileusnic i col., 2005), essent un dels principals causants del deteriorament cognitiu característic en el curs de la malaltia. Així doncs, s'han generat diversos models de ratolí que sobreexpressen el gen que codifica la proteïna precursora de l'amiloide, anomenada APP ('amiloid precursor protein'), que ha permès aprofundir en els mecanismes subjacents a aquesta patologia (Lim i col., 2005; Singer i col., 2005). Un altre model important és el del silenciament del gen BACE-1, que codifica una proteïna encarregada de processar l'APP tot formant dipòsits d'amiloide (Domínguez i col., 2005). També hi ha models de mutacions per a les proteïnes presenilina-1 i 2 (Dewachter i col., 2002; Jankowsky i col., 2004) i de la lipoproteïna transportadora de colesterol, l'apolipoproteïna E o APOE (Harris i col., 2003). Un dels punts importants en enginyeria genètica és que es poden observar variacions en la incidència de la malaltia mitjançant combinació, en un sol model murí, de diverses modificacions genètiques com en el cas



Figura 2. Ratolí control sotmès a cirurgia d'implantació d'èlectrodes per avaluar els canvis sinàptics *in vivo* durant l'aprenentatge.

del transgènic BACE/APP (Willem i col., 2004). Un altre exemple és el doble mutant de BACE/Tau (Perez i col., 2005) o el PS2/APP (Richards i col., 2003). En el cas del Parkinson, s'ha identificat el gen de la α -sinucleïna (Giasson i col., 2002), per al qual s'han generat ratolins de sobreexpressió i de silenciament, ambdós relacionats per una altra banda amb la malaltia d'Alzheimer. En aquesta patologia s'han identificat altres gens com a possibles candidats. Així s'ha generat el mutant *knock-out* per a parkina (PARK2) i el mutant per al gen DJ-1, així com el mutant heterozigot per al gen Nurr1. En altres tipus de malalties neurodegeneratives, com l'esclerosi lateral amiotròfica s'han descrit models d'expressió de mutacions de l'enzim SOD1, estretament relacionat amb l'aparició d'ELA familiar (Teng i col., 2006; Amendola i col., 2004). En aquest model murí s'ha observat una degeneració motora similar a la que presenten els pacients que se'ls ha diagnosticat ELA.

De fet, aquests models murins presenten un fenotip similar a l'observat en pacients humans, malgrat que, òbviament, els ratolins no són humans en miniatura. No obstant això, la severitat amb què fan aparició les malalties d'aquest tipus en humans no s'observa massa vegades en models mu-

rins, en ocasions essent els símptomes en aquests més suaus. Sumat a aquest factor interespecífic, hom troba que en l'abordatge de la fenotipació conductual apareixen certes dificultats tècniques (Figura 2). La primera, tot i que sembli jocosa, és que els ratolins no llegeixen les nostres publicacions científiques, cosa per la qual no saben què esperem d'ells. I la segona és que no ens poden explicar com se senten o què estan experimentant durant un test conductual. Per això hom ha hagut de construir al voltant de la fenotipació conductual uns criteris de validesa que ens permetin acceptar l'homologia d'un model amb la malaltia humana a diferents nivells, a més de considerar uns criteris estàndarditzats per acceptar certes proves com a vàlides per estudiar un determinat fenotip. Aquests criteris es poden establir gràcies al fet que, si bé el repertori conductual o ecograma del ratolí és diferent al de l'humà, part de les conductes que es poden observar estan conservades evolutivament a través de les espècies i depenen d'estructures i processos similars. És precisament l'observació d'aquestes conductes el que ens permetrà registrar els efectes produïts per una modificació genètica en un model murí d'una malaltia i extrapolar-los d'aquesta espècie a la humana. Com s'ha comentat anteriorment, per arribar a això els investigadors de la



Figura 3. Laberint Aquàtic de Morris. Ratolí que arriba a la plataforma en una sessió de plataforma visible.

conducta, etòlegs o especialistes de la fenotipació, es van posar d'acord en una sèrie de criteris per a determinar paràmetres de l'estudi fenotípic de malalties neuropsiquiàtriques (McKinney i Bunney, 1969; Griebel i col., 1996). Un d'ells és el criteri de validesa aparent, que fa referència al fet que la resposta conductual observada en els ratolins ha de tenir la mateixa estructura que les respostes conductuals observades en pacients. Una altra n'és la validesa predictiva, que fa referència a la similitud de l'eficàcia farmacològica existent entre el model murí i la malaltia a l'humà. I per últim, l'anomenada validesa de cons-trucció, que exigeix que la patogènia i els substrats neurobiològics subjacents al trastorn han de ser iguals en ratolins i humans.

Aplicant aquests criteris i basant-nos en l'estudi de malalties neurodegeneratives, per a avaluar el fenotip hem de dissenyar una bateria conductual que permeti determinar aquests criteris de validesa i que avaluï paràmetres extrapolables a la malaltia en humans. Per tant, per cada ma-

laltia hi haurà una bateria especial composta de proves conductuals específiques. Posant com a exemple les tres malalties citades anteriorment, en una bateria per estudiar la malaltia d'Alzheimer haurem de posar èmfasi en l'anàlisi del comportament relacionat amb aspectes cognitius alterats, que són els que caracteritzen precisament aquesta patologia. Entre ells hi ha el laberint aquàtic de Morris (Morris, 1984; Wilcoxon i col., 2007), una prova que ja s'ha convertit en clàssica per avaluar l'aprenentatge visual i espacial en models murins, que consisteix en analitzar la latència d'escapament d'un ratolí quan aquest és introduït en un tanc ple d'aigua amb una plataforma amagada al seu interior (Figura 3). Un ratolí amb capacitat cognitiva conservada reduirà dia a dia la latència d'arribada a la plataforma, mentre que els models murins de malaltia d'Alzheimer probablement mostrin latències molt més elevades degut al deteriorament cognitiu associat a aquesta patologia

l'exposició a objectes tant nous com coneguts. En aquest cas, en un animal amb problemes cognitius s'observaran alteracions en el reconeixement d'objectes familiars (Zhang i col., 2006). Quan hem d'abordar altres patologies neurodegeneratives amb components motors, com la malaltia de Parkinson, les bateries conductuals han d'enfocar-se precisament a l'estudi de paràmetres relacionats amb la conducta motora. Amb aquest propòsit podem utilitzar proves conductuals com el *rotarod*, en què el ratolí ha de tenir una coordinació motora adequada amb les potes anteriors i posteriors per tal de no caure de la roda giratòria. Un model murí per aquesta malaltia probablement mostri una menor capacitat per aguantar-se sobre una roda giratòria que el seu homòleg control (Colebrooke i col., 2006). Un altre test interessant per formar part d'una bateria d'estudi de la malaltia de Parkinson és la cinta sense fi, aparell en què el ratolí ha de caminar/córrer per una cinta



Figura 4. Camp Obert. Ens permet estudiar el patró basal de locomoció.

(Zhang i col., 2006). Una versió d'aquest protocol és el laberint aquàtic radial, que permet avaluar amb eficàcia paràmetres com la memòria de referència i la memòria de treball (Lovasic i col., 2005) o el test de reconeixement d'objectes, basat en l'avaluació de la reacció d'un ratolí a

mecànica per evitar una lleugera descàrrega elèctrica a les potes. Un ratolí model de Parkinson realitzarà pitjor la tasca que un ratolí sense modificacions genètiques (Amende i col., 2005). Finalment, en el cas de l'ELA, pràcticament qualsevol test que avaluï components motors grossers

serà útil per a determinar el fenotip de la malaltia en models murins. Des d'un test de camp obert, que ens permet determinar el patró de locomoció basal dels ratolins, fins a un test de força prèmsil, amb el qual podem avaluar de manera objectiva la força i el to muscular en les extremitats superiors dels ratolins. Ambdós paràmetres estan alterats en pacients diagnosticats amb ELA i, per tant, ambdós protocols experimentals són eines útils per avaluar la incidència de la malaltia en els models modificats genèticament.

Així doncs, dissenyar una bateria de proves conductals adequada depèn únicament de la correcta identificació dels símptomes característics de les patologies que volem estudiar i de l'adequada definició dels paràmetres avaluable en els nostres models murins, complint amb el criteri de validesa aparent. Tot i la complexitat de l'etiologia dels trastorns neurodegeneratius, la fenotipació conductual ens permet abordar-la mitjançant models vàlids. En aquest context, tant la investigació en biologia molecular bàsica com la dirigida a l'elaboració de fàrmacs necessiten aquests models murins de malalties humanes i, sobretot, la seva correcta fenotipació per poder dilucidar els seus mecanismes subjacents i, consegüentment, generar teràpies dirigides a la seva prevenció o potser a la reversió de part dels seus fenotips.



L'Ignasi Sahún Abizanda va néixer a Barcelona el 1973. Va estudiar Criminologia i Psicologia i va treballar durant 5 anys

en un centre de justícia juvenil. Va aconseguir una beca FI de la Generalitat i va endinsar-se en el món de la ciència de la mà de la Dra. Mara Dierssen. Va estar un any a l'IRO de Bellvitge i després el grup es va mudar al CRG, tot canviant les vistes al tanatori per les vistes a la platja. Es va doctorar el desembre del 2006, amb un estudi de la relació entre gens i malalties neuropsiquiàtriques, concretament amb la caracterització d'un model murí transgènic per al pànic i l'ansietat. Actualment treballa com a tècnic de fenotipació al CRG-UPF-PRBB.

REFERÈNCIES

- Amende I., Kale A., McCue S., Glazier S., Morgan J. P. and Hampton T. G. (2005) *Gait dynamics in mouse models of Parkinson's disease and Huntington's disease. J Neuroengineering Rehabil* 2, 20.
- Amendola J., Verrier B., Roubertoux P. and Durand J. (2004) *Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Eur J Neurosci* 20, 2822-2826.
- Colebrooke R. E., Humby T., Lynch P. J., McGowan D. P., Xia J. and Emson P. C. (2006) *Age-related decline in striatal dopamine content and motor performance occurs in the absence of nigral cell loss in a genetic mouse model of Parkinson's disease. Eur J Neurosci* 24, 2622-2630.
- Dewachter I., Reverse D., Caluwaerts N., Ris L., Kuiperi C., Van den Haute C., Spittaels K., Umans L., Serneels L., Thiry E., Moechars D., Mercken M., Godaux E. and Van Leuven F. (2002) *Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice. J Neurosci* 22, 3445-3453.
- Dominguez D., Tournoy J., Hartmann D., Huth T., Cryns K., Deforce S., Serneels L., Camacho I. E., Marjaux E., Craessaerts K., Roebroek A. J., Schwake M., D'Hooze R., Bach P., Kalinke U., Moechars D., Alzheimer C., Reiss K., Saftig P. and De Strooper B. (2005) *Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. J Biol Chem* 280, 30797-30806.
- Effron A. S. (1951) *How to treat parkinsonism. Gp* 4, 61-63.
- Friedman A. P. and Freedman D. (1950) *Amyotrophic lateral sclerosis. J Nerv Ment Dis* 111, 1-18.
- Giasson B. I., Ischiropoulos H., Lee V. M. and Trojanowski J. Q. (2002) *The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Free Radic Biol Med* 32, 1264-1275.
- Griebel G., Blanchard D. C. and Blanchard R. J. (1996) *Predator-elicited flight responses in Swiss-Webster mice: an experimental model of panic attacks. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 20, 185-205.
- Harris F. M., Brecht W. J., Xu Q., Tesseur I., Kekoni L., Wyss-Coray T., Fish J. D., Masliah E., Hopkins P. C., Scearce-Levie K., Weisgraber K. H., Mucke L., Mahley R. W. and Huang Y. (2003) *Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10966-10971.
- Jankowsky J. L., Fadale D. J., Anderson J., Xu G. M., Gonzales V., Jenkins N. A., Copeland N. G., Lee M. K., Younkin L. H., Wagner S. L., Younkin S. G. and Borchelt D. R. (2004) *Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. Hum Mol Genet* 13, 159-170.
- Krigman M. R., Feldman R. G. and Bensch K. (1965) *Alzheimer's Presenile Dementia. A Histochemical and Electron Microscopic Study. Lab Invest* 14, 381-396.
- Lim H. J., Cho J. S., Oh J. H., Shim S. B., Hwang D. Y., Jee S. W., Lee S. H., Sheen Y. Y. and Kim Y. K. (2005) *NSE-controlled carboxyl-terminus of APP gene over-expressing in transgenic mice induces altered expressions in behavior, Abeta-42, and GSK3beta binding proteins. Cell Mol Neurobiol* 25, 833-850.
- Lovasic L., Bauschke H. and Janus C. (2005) *Working memory impairment in a transgenic amyloid precursor protein TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. Genes Brain Behav* 4, 197-208.
- Mileusnic R., Lancashire C. L. and Rose S. P. (2005) *Amyloid precursor protein: from synaptic plasticity to Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci* 1048, 149-165.
- Morris R. (1984) *Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods* 11, 47-60.
- Perez M., Ribe E., Rubio A., Lim F., Moran M. A., Ramos P. G., Ferrer I., Isla M. T. and Avila J. (2005) *Characterization of a double (amyloid precursor protein-tau) transgenic: tau phosphorylation and aggregation. Neuroscience* 130, 339-347.
- Richards J. G., Higgins G. A., Ouagazzal A. M., Ozmen L., Kew J. N., Bohrmann B., Malherbe P., Brockhaus M., Loetscher H., Czech C., Huber G., Bluethmann H., Jacobsen H. and Kemp J. A. (2003) *PS2APP transgenic mice, coexpressing hPS2mut and hAPPsw, show age-related cognitive deficits associated with discrete brain amyloid deposition and inflammation. J Neurosci* 23, 8989-9003.
- Singer O., Marr R. A., Rockenstein E., Crews L., Coufal N. G., Gage F. H., Verma I. M. and Masliah E. (2005) *Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. Nat Neurosci* 8, 1343-1349.
- Teng Y. D., Choi H., Huang W., Onario R. C., Frontera W. R., Snyder E. Y. and Sabharwal S. (2006) *Therapeutic effects of clenbuterol in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. Neurosci Lett* 397, 155-158.
- Willem M., Dewachter I., Smyth N., Van Dooren T., Borghgraef P., Haass C. and Van Leuven F. (2004) *beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 increases amyloid deposition in brain parenchyma but reduces cerebrovascular amyloid angiopathy in aging BACE x APP[V717I] double-transgenic mice. Am J Pathol* 165, 1621-1631.
- Zhang L., Xing Y., Ye C. F., Ai H. X., Wei H. F. and Li L. (2006) *Learning-memory deficit with aging in APP transgenic mice of Alzheimer's disease and intervention by using tetrahydroxystilbene glucoside. Behav Brain Res* 173, 246-254.