

CONDUCTA OLFATIVA EN UN MODELO MURINO DE ALZHEIMER

Guillermo Coronas-Sámamo, Ivett Medina-Aguirre, Azucena Aguilar Vázquez, Wendy Portillo-Martínez, Irma González-Luna, Raúl Paredes-Guerrero, Sofía Díaz-Cintra
Instituto de Neurobiología, Campus UNAM

Conducta olfativa en un modelo murino de alzheimer

Resumen:

En el Instituto de Neurobiología campus UNAM-Juriquilla se estudian los aspectos conductuales, neuronales y moleculares, relacionados con la enfermedad de Alzheimer (EA) en un modelo de ratón transgénico (3XTg-AD, donado por el Dr. F. LaFerla, de la Universidad de California) y que es homocigótico para las tres proteínas humanas asociadas a la enfermedad. La ventaja de trabajar con este modelo es que además de su viabilidad, permite estudiar los cambios progresivos de las alteraciones neuronales, principalmente en las áreas más susceptibles como son la corteza cerebral y el hipocampo. En el humano, un aspecto del diagnóstico temprano de la enfermedad se relaciona con la disminución en la calidad de la olfacción que culmina con la incapacidad para discriminar diferentes olores volátiles, un aspecto relacionado con la presencia de agregados de beta amiloide en el bulbo olfatorio principal (BOP). Nuestro interés se centra en caracterizar la discriminación olfativa en el ratón transgénico (3xTg-AD) que es un homocigoto para la ED, con la finalidad de comprobar si también se presenta una alteración temprana asociada a la patología. Hasta ahora los datos obtenidos, a través de las pruebas conductuales de preferencia y motivación olfatoria, demuestran un deterioro en la olfacción del 3xTg-AD a los 10 meses de edad, principalmente asociada al BOP.

Palabras clave: beta amiloide, redes neurofibrilares, enfermedad de Alzheimer, olfacción, modelo murino 3xTg-AD.

Olfactory behaviour in a murine alzheimer model

Abstract:

At the Institute of Neurobiology UNAM campus-Juriquilla explores behavioral, neural and molecular aspects, associated with Alzheimer's Disease (EA) in a model of transgenic mouse (3XTg-AD), donated by Dr. F. LaFerla, at the University of California, and that is homozygous for the three human proteins associated with the disease. The advantage of working with this model is that in addition to its viability, allows us to study the progressive changes of the neuronal alterations mainly in the areas more susceptible as are the cerebral cortex and the hippocampus. In the human, an aspect of early diagnosis of the disease is related to the decline in the quality of the olfaction that culminates with the inability to discriminate different smells volatile an issue relating to the presence of aggregates of beta amyloid in the olfactory bulb main (BOP). Our interest focuses on characterize the olfactory discrimination in the transgenic mouse (3xTg-AD) that is a homozygous for ED, with the aim of check if also an alteration early associated with the pathology. Until now the data obtained through the evidence behavioral preference and the olfactory motivation showed deterioration in the smelling of 3xTg-AD for the 10 months of age, mainly associated with the BOP.

Keywords: beta amyloid, neurofibrillary tangles, Alzheimer's disease, olfaction, mouse model 3xTg-AD

Introducción

La Enfermedad de Alzheimer (EA)

Es una patología neurodegenerativa, crónica e irreversible (Maréchal et al., 2006), en cuya etapa temprana se presentan alteraciones en la memoria declarativa; en la ubicación espacial y temporal, y la identificación de objetos. En las etapas tardías se presenta una demencia severa que se acompaña de alteraciones motoras (Forstl & Kurz, 1999). Afecta a un individuo de cada 25 en los adultos mayores \pm 65 años, aumentando a 4 alrededor de los 80 años (Hebert et al., 2003), lo que representa una cifra a nivel mundial de más de 20 millones de personas con esta enfermedad y dado el envejecimiento progresivo de la población, se estima que estas cifras llegarán a los 40 millones en 2040 (Zacchigna, et al., 2008). Es por esto que, la EA, por su alta incidencia poblacional, adquiere una importancia relevante debido a las implicaciones que pueden repercutir en el ámbito social, político y económico, a lo que se suma el fuerte impacto psicológico en los familiares de quien la padece (Girones et al., 2002).

Signos patognomónicos¹ de EA

Desde su descripción por el Dr. Alois Alzheimer, se establecieron como signos patognomónicos de la EA, la formación de placas seniles compuestas por agregados del péptido β -amiloide (A β) y la aparición de redes neurofibrilares causadas por la proteína tau hiperfosforilada, acompañados de degeneración neuronal, pérdida de sinapsis, daño en vasculatura y gliosis reactiva, que se correlaciona con deterioro cognitivo y pérdida de la memoria, además de cambios celulares y moleculares asociados (Ball et al., 1985; Rogawski, et al., 2003; Bojarzki, et al., 2007).

Hasta el momento no existen exámenes específicos de laboratorio, ni de imágenes, que permitan confirmar la EA en vida, y debido a que otro tipo de enfermedades puede causar pérdida de memoria, un diagnóstico que es definitivo para determinar la EA, consiste en el examen *postmortem* del cerebro para establecer definitivamente que la demencia es de tipo Alzheimer (Mattson, 2004). Por ello, es muy importante contar con diferentes líneas de investigación que se interesen en determinar la etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Modelos Experimentales de la EA

A partir de 1970 se han desarrollado modelos experimentales de la EA, siendo éstos instrumentos valiosos que intentan explicar las bases moleculares, celulares, patológicas y conductuales en humanos. Sin embargo, actualmente ninguno es capaz de reproducir fielmente todas y cada una de las características de esta complicada enfermedad, pero representan en su conjunto uno de los avances más notables para su investigación, y en turno permiten el avance en el diseño y ensayo de nuevas estrategias terapéuticas (Wolfe, 2002; Balducci & Forloni, 2011).

En la actualidad se dispone de otros modelos experimentales para el estudio de esta patología como lo es la rata, el embrión de pollo, el perro, el conejo, la mosca de fruta, los cetáceos, los

¹ Denominación de aquellos signos (manifestaciones visibles) o síntomas (manifestaciones no visibles, subjetivas) que, si están presentes, aseguran que el sujeto padece un determinado trastorno.

primates (Walsh & Selkoe, 2007). En todos estos modelos animales, un objetivo fundamental es poder replicar los síntomas y las lesiones cerebrales responsables de la EA. Por ello, la variedad de los mismos y que tienen que ver con varios aspectos en su desarrollo: desde el metabolismo de la proteína precursora del amiloide (APP humana y las formas mutadas) y su degradación por la enzima (neprilisina) y de la apolipoproteína² E (APOE); o de la presenilina (PS) o los dobles mutantes PS/APP. Otros más, están basados en la proteína tau (tau-JNPL3) y finalmente los triple transgénicos PS/APP/tau, cuyos cambios han sido reportados en diversos trabajos (Nunan & Small; 2000; Pratico *et al.*, 2001; Yasojima *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2006).

En este trabajo nos referiremos sólo al modelo reconocido como el triple transgénico (3xTg-AD), desarrollado por el grupo del Dr. LaFerla en la Universidad de California el cual es *knock-in* para PS1_{M146V} APP_{Swe} y tau_{P3001} (Oddo *et al.*, 2003a,b), cuya característica principal es de ser el primer modelo en desarrollar las placas del péptido A β y la hiperfosforilación de la proteína tau en regiones cerebrales relevantes para la EA como el hipocampo, la corteza, el subiculum (Figura 1) y la amígdala entre otras estructuras relacionadas con funciones cognitivas (Ball *et al.*, 1985).

Un aspecto poco explorado es la conexión entre el hipocampo y el BO accesorio de los roedores y se ha reportado que la formación hipocampal, está anatómica y funcionalmente asociada a las estructuras olfatorias. En tanto la corteza entorrinal recibe proyecciones del BO, que constituye la entrada al hipocampo, hay una conexión hacia las células piramidales del CA1 y hacia las neuronas ventrales subiculares, áreas en donde se inicia la patología de la EA.

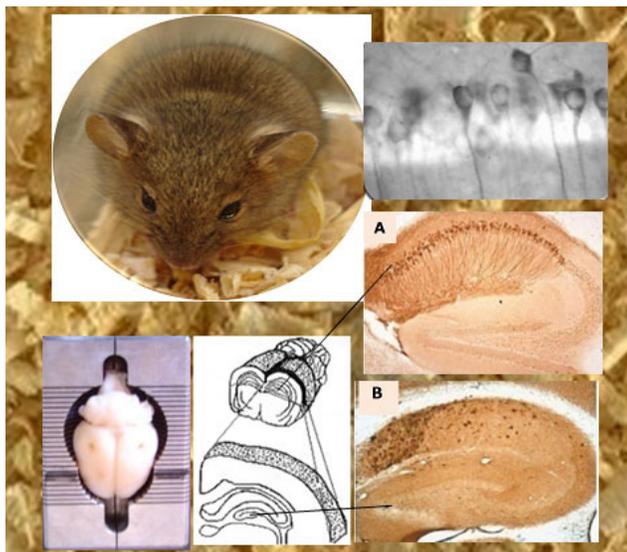


Figura 1. Imágenes del Ratón 3xTg-AD, su cerebro y la localización del hipocampo, en donde se inicia la formación de redes neurofibrilares (A) y placas de la proteína beta amiloide (B).

Olfacción y Alzheimer

Uno de los síntomas más tempranos que se observa en los pacientes con EA es una disminución en la detección y discriminación de olores (Mesholam *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 1998). Esta característica se ha podido replicar en los animales transgénicos que expresan el fenotipo de la EA, junto con la sobreproducción de la A β y se ha relacionado con la presencia de APOE² es esencial para el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. El tipo E4 está implicada con aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer y desarrollo cognitivo inadecuado.

temprana de alteraciones en la funcionalidad del bulbo olfatorio (Kawarabayashi *et al.*, 2001). Esta pérdida de función olfativa fue inicialmente reportada a partir de los trabajos de Averbach en 1983, asociado a una pérdida neuronal, la presencia de placas seniles y formación de redes neurofibrilares en el núcleo olfatorio anterior en humanos (Averbach, 1983, Esiri y Wilcock, 1984). Además de un deficiente sistema colinérgico en los tubérculos olfatorios observados en estudios *post-mortem* de cerebros humanos que presentaron la EA (Simpson *et al.*, 1984). Por lo que se propone como síntoma temprano de la enfermedad la deficiencia olfativa, la cual se asocia también a la disminución del apetito del individuo, lo cual repercute en la pérdida de peso y en un pobre estado de nutrición con los cambios anatómicos en el bulbo olfatorio principal y en el organismo en general, ante la presencia de la EA. (Warner *et al.*, 1986).

Diseño experimental

Todo el diseño experimental se llevó a cabo con base en los lineamientos bioéticos del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), para el uso de animales experimentales y de acuerdo con las normas estipuladas en la “Guide for care and use of Laboratory animals” del NIH (1996) y la National Academy of Science (2003), el cual fue aprobado por el Comité de Bioética del INB-UNAM.

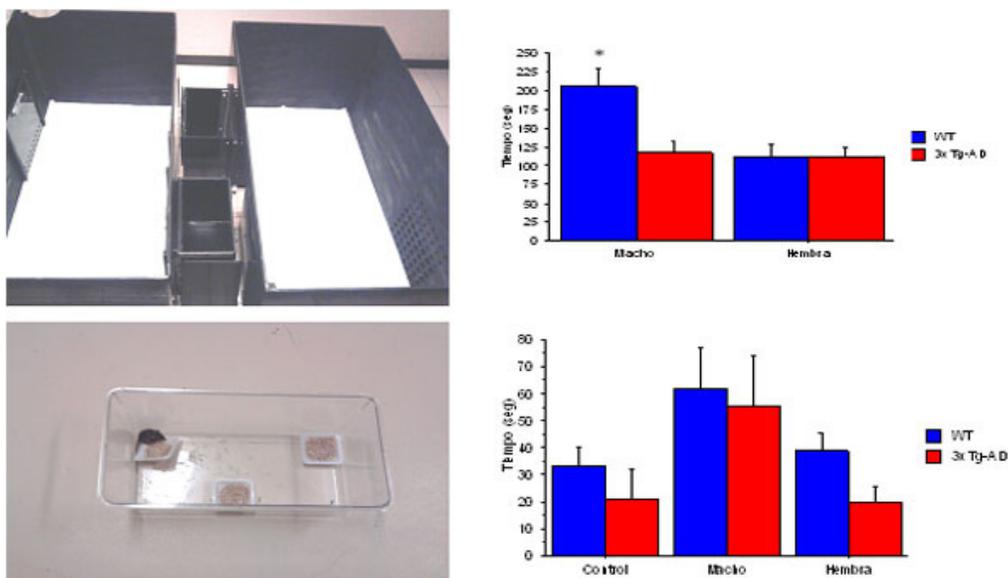


Figura 2. Fotografías de los dispositivos usados para las pruebas conductuales de motivación y de preferencia sexual. Arriba, dispositivo formado por dos arenas (cajas rectangulares grandes) en donde se colocó a las hembras y otros (rectangulares chicos) en donde se colocó un macho o una hembra, respectivamente. La conducta se midió por el tiempo que la hembra exploró las cajas chicas. Las gráficas muestran los resultados obtenidos en esta tarea conductual de motivación sexual, los ratones WT (hembras) presentaron mayor tiempo en el compartimiento del macho, teniendo diferencias significativas, no así la ratona 3xTg-AD que no mostró preferencia por los dos compartimentos. Abajo, el dispositivo en donde se colocaron tres recipientes cada uno con diferentes olores sexualmente relevantes (orina de hembra, de macho o solución salina). Se midió el tiempo de exploración de la hembra en cada estímulo, las gráficas de la tarea conductual de preferencia sexual en donde se aprecia una tendencia de los dos grupos a preferir el compartimiento con aserrín de machos, indicando que esta conducta se preserva en la ratona 3xTg-AD. En las pruebas de discriminación olfatoria de olores de comida se realizó utilizando los estímulos fresa y canela, en donde se observó que los ratones WT discriminan estos olores pero los 3xTg-AD tienen alterada esta capacidad (Figura 3).

Conducta olfatoria en el 3xTg-AD

Hemos estudiado en el ratón triple transgénico (3xTg-AD) cómo su conducta olfatoria para odorantes novedosos se modifica conforme avanza la patología, mediante la realización de las siguientes tareas conductuales: motivación sexual, preferencia sexual y discriminación olfativa de olores sexualmente relevantes y de olores volátiles (fresa y canela).

En la prueba de motivación sexual (figura 2) se muestra que el ratón hembra control o *wild type* (WT) tiene preferencia por el compartimento que alberga a una hembra, lo cual es reflejo de su preferencia sexual. Mientras que en la hembra del ratón 3xTg-AD no se observan diferencias significativas en el tiempo que pasa en ambos compartimentos, lo cual sugiere que no tiene preferencia de olores sexualmente relevantes.

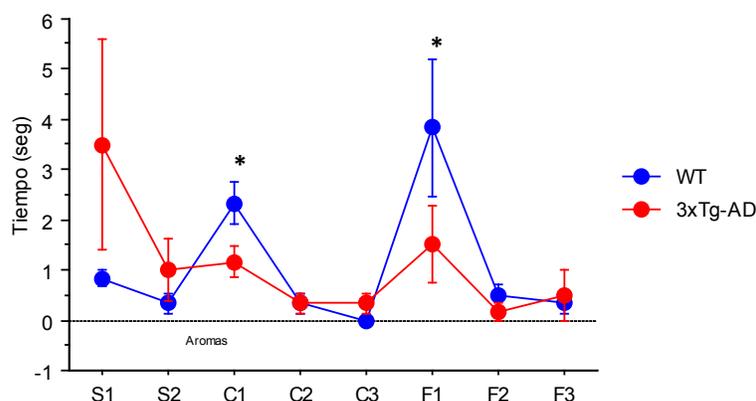


Figura 3. Prueba de discriminación olfativa con olores volátiles. Se midió el tiempo que tarda el ratón en olfatear por 2 minutos olores (2 veces solución salina, y 3 veces para canela y fresa). En esta gráfica se demuestra que las ratonas sanas o *wild type* (WT) discriminan entre dos olores volátiles (S2vsC1 y C3vsF1), en comparación con las ratonas transgénicas que no muestran diferencias significativas. S= solución salina, C= esencia de canela, F= esencia de fresa. Diferencias significativas se indican con asterisco.

Conclusiones

Estos datos en conjunto muestran una pérdida del olfato en los ratones 3xTg-AD, que se refleja con mayor severidad en la tarea de discriminación olfativa con olores volátiles. Mientras que la conducta de discriminación olfativa con olores sexualmente relevantes se encuentra mejor conservada. Dado que el bulbo olfatorio principal es la zona en donde se procesa la olfacción de olores volátiles, principalmente, nuestro interés se encamina en detectar agregados de proteína A β y marañas neurofibrilares en esta región, comparado con el bulbo olfatorio accesorio, que es la región anatómica en donde se procesa la información de olores sexualmente relevantes en el ratón. Otro aspecto es la activación de las neuronas del bulbo olfatorio principal (BOP) por los olores (investigaciones en curso). Además, en un estudio realizado por nuestro grupo en este modelo 3xTg-AD, se determinó que existe una disminución de la densidad vascular de zonas susceptibles a la enfermedad (hipocampo y corteza frontal) en una edad temprana (2 meses),

pero esta disminución no permanece a la edad de 10 meses, lo que se puede interpretar que existen procesos plásticos vasculares (angiogénesis) que evitan que esta alteración vascular sea evidente en una etapa tardía (González-Luna, 2010 resultados no publicados).

Agradecimientos

Por la asistencia técnica a la Psicol. Pineda-Martínez V.T y las facilidades del Bioterio del INB y al MVZ García-Servín M. Al apoyo de las becas otorgadas por el CONACYT y por la DGAPA UNAM.

Bibliografía

Averback P. 1983. Two new lesions in Alzheimer's disease. *Lancet* 2:1203.

Balducci C, Forloni G. APP. 2011. Transgenic Mice: Their Use and Limitations. *Neuromolecular Med* (En prensa).

Ball MJ, Hachinski V, Fox A, Kirshen AJ, Fishman M, Blume W, Krai VA, Merskey H. 1985. A new definition of Alzheimer's disease: A hippocampal dementia. *Lancet* 82: 4531-4534.

Bojarzki L, Herms J, Kuznicki J. 2007. Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 52:621-633.

Esiri MM, Wilcock GK. 1984. The olfactory bulbs in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 47:56-60.

Forstl H, Kurz A. 1999. Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 249:288-290.

Girones X, Guimera A, Cruz-Sanchez FF. 2002. Alzheimer disease. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* 59:13-38.

González-Luna I, 2010. Tesis de Maestría en Ciencias, INB-UNAM.

Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. 2003. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol.* 60:1119-1122.

Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. 2001. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid beta protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:372-381.

LaFerla FM, Green KN, Oddo S. 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8:499-509.

Maréchal L, Le I, Hannequin D, Campion D, Brice A. 2006. Alzheimer's disease and other dementias in Psychopharmacogenetics. Eds. Gorwood Philip & Michel Hamon. Springer Science Business Media, Inc.

Mattson MP. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 430:631-639.

Meshulam RI, Moberg PJ, Mahr RN, Doty RL. 1998. Olfaction in neurodegenerative Disease. *Arch Neural.* vol 55.

- Nunan J, Small DH. 2000. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett* 483:6-10.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. 2003a. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 24:1063-1070.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. 2003b. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*. 39:409-421.
- Peña F, Guitérrez-Lerma AI, Quiroz-Baez R, Arias C. 2006. The role of β -amyloid protein in synaptic function: Implications for Alzheimer's disease therapy. *Curr. Neuropharmacol*. 4:149-163.
- Practico D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VMY. 2001. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. 21:4183-4187.
- Rogawski MA, Wenk GL. 2003. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *Cns Drug Rev*. 9:275-308.
- Saiz-Sanche D, Ubeda-Bañon I, de la Rosa-Prieto C, Argandoña-Palacios L, García-Muñozguren S, Insausti R, Martínez-Marcos A. 2010. Somatostatin, tau, and β -amyloid within the anterior olfactory nucleus in Alzheimer disease. *Exp Neurol*. 223:347-350.
- Simpson J, Yates CM, Gordon A, St Clair DM. 1984. Olfactory tubercle choline acetyltransferase activity in Alzheimer's-type dementia. *Neurosurg Psychiatry*. 47:1138-1139.
- Thompson M, Knee K, Golden C. 1998. Olfaction in persons with Alzheimer's disease. *Neuropsychology Rev*. vol. 8, No. 1.
- Walsh DM, Selkoe DJ. 2007. A beta oligomers – a decade of discovery. *J Neurochem*. 101:1172-1184.
- Warner MD, Peabody CA, Flattery JJ, Tinklenberg JR. 1986. Olfactory deficits and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 21:116-118.
- Wolfe MS. 2002. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nat Rev Drug Discov*. 1:859-866.
- Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL. 2001. Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res*. 919:115-121.
- Zacchigna S, Lambrechts D, Carmeliet. 2008. Neurovascular signaling defects in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 9:169-181.