



¿Cuál es el mejor modelo de estudio de la enfermedad de Alzheimer?

Which is the best model of study of the Alzheimer's disease?

Gonzalo Emiliano Aranda-Abreu^{1*}, María Elena Hernández^{1*}, Luis Isauro García^{1**}

¹Programa de Neurobiología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. México. ^{*}Cuerpo Académico de Neuroquímica. .

^{**}Cuerpo Académico de Neurociencias.

Resumen

El problema que plantea el estudio de la enfermedad de Alzheimer, aparte de ser una enfermedad multigénica, es que no se tiene un modelo de estudio ya sea *in vivo* o *in vitro* que nos permita entender, de manera factible, como es que se inicia la enfermedad. Los modelos hasta ahora propuestos son ratas o ratones transgénicos, sin embargo éstos a lo largo de la vida no presentaran todas las características de la enfermedad, lo mismo sucede con los cultivos celulares. Es necesario que se acepte y se defina la enfermedad en estos modelos y que cumplan con las características que hasta ahora solo ofrecen los estudios post-mortem.

Palabras clave: Alzheimer, Células, Cultivos, Modelo, Ratones, Transgénicos.

Abstract

A problematic in the study of Alzheimer's disease is the lack of a good model that allows us either *in vivo* or *in vitro* to understand how the disease initiates. So far, the proposed models are mainly transgenic mice or rats, however, along their lifetime they do not present all the features of this disease and cell cultures present this same problematic. Thus, we have felt the need to define Alzheimer's disease in acceptable models able to present all the characteristic events taking place in the pathogenesis of Alzheimer's that until now we can only observe in postmortem analysis.

Keywords: Alzheimer, Cells, Culture, Model, Mice, Transgenic.

Correspondencia: Dr. Gonzalo Emiliano Aranda-Abreu, Programa de Neurobiología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver., Tel.: (228) 841-8900 Ext. 13616, Correo: garanda@uv.mx

1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la más común de las enfermedades neurodegenerativas en los países industrializados.¹

Genéticamente la enfermedad es compleja y heterogénea; en formas hereditarias

tempranas están involucradas mutaciones en los genes de las presenilinas 1 y 2 y la proteína precursora amiloidea,¹ en formas tardías se ha demostrado que existe un gen como factor de riesgo, este gen APOE4 ha sido implicado como el principal factor asociado a la enfermedad de forma tardía, llámese también forma esporádica.²

Este es un artículo de libre acceso distribuido bajo los términos de la licencia de Creative Commons, (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en algún medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.



Estudios post-mortem en pacientes con Alzheimer han demostrado la formación de placas amiloides y lesiones vasculares.^{3, 4}

Una de las preguntas que quisiéramos someter a discusión es: ¿cuál sería la mejor manera de estudiar la enfermedad de Alzheimer? o ¿cuál sería la aproximación experimental más adecuada para estudiar la EA?

Sabemos cómo termina la enfermedad, sin embargo, no se sabe como comienza, la mayoría de los modelos de estudio utilizan roedores, principalmente ratones.

Roedores como modelo de estudio para la enfermedad de Alzheimer

Desde 1902 se han utilizado roedores como modelo de estudio para la EA, que van desde análisis genético hasta ratones transgénicos y “knock out”.

Hoy en día son utilizados los roedores para el estudio de un sin número de enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson,^{5, 6, 7}, esclerosis múltiple,^{8, 9} esclerosis lateral amiotrófica^{10, 11} y algunos tipos de ataxias hereditarias,^{12, 13} etc.

El motivo del uso de roedores para el estudio de enfermedades neurodegenerativas se basa, principalmente, en el hecho de que cuando se llevan a cabo alineamientos múltiples de secuencia, tanto de rata como de ratón, éstos comparten un 97% de homología entre secuencias menores a 100 kilobases.¹⁴ Esta homología los hace un buen modelo para estudiar la etiología de este tipo de enfermedades en el humano.

Para hacer referencia y utilizar algunos números, se estima que en el Reino Unido durante el 2004 se utilizaron 1,910,110 ratones, 464,727 ratas y 37,475 de otros tipos de roedores. En Estados Unidos de América se ha estimado que se utilizaron para investigación alrededor de 15 a 20 millones de roedores. Los ratones son la especie más común utilizada por su disponibilidad, dimensión, bajo costo, fácil manejo y tasa rápida de reproducción.¹⁵

Estudio de la enfermedad de Alzheimer en ratones

El estudiar la enfermedad de Alzheimer ha sido difícil en ratones debido a que estos no presentan realmente una patología parecida a la del ser humano. Aunado a lo anterior, la dieta y los factores ambientales son también diferentes en las dos especies.¹⁶ Otro factor que resulta importante es el tiempo de vida, lo roedores (rata y ratón) no duran más de dos años y la enfermedad de Alzheimer requiere de tiempo para que se desarrolle.

El uso de ratones transgénicos han sido una herramienta indispensable para lograr entender ciertos mecanismos de enfermedades y sobretodo de expresión de genes.^{17, 16} Sin embargo, debemos tener modelos para estudiar la enfermedad que nos permitan en un periodo corto (meses), entender los mecanismos que podrían desencadenar la enfermedad.

Estudio de la enfermedad de Alzheimer en modelos celulares

Durante los últimos 10 años, el entendimiento de los mecanismos involucrados en la EA ha avanzado a grandes pasos gracias al estudio de las principales proteínas involucradas empleando cultivos celulares.

De esta forma, fue posible determinar como el mensajero de tau se localizaba en el axón de una neurona y cuáles eran las señales involucradas en este proceso.¹⁸ Otros estudios demostraron como la neurona era capaz de distribuir ciertas proteínas a los diferentes compartimentos, MAP2 localizado en las dendritas^{19, 20, 21} y Tau localizada en el axón.

Tau es una proteína primordial para mantener la polaridad de la neurona. Ginzburg et al., mostraron con oligonucleótidos antisentido contra el mensajero de tau, que esta proteína estaba involucrada en la polaridad neuronal, debido a que la neurona sufre cambios drásticos en su morfología característica cuando se deja de expresar tau.^{22, 23, 24}

Cuando se secuenció el mensajero de tau²⁵ se determinó que poseía una región 3' no traducida muy extensa, de 3884 bases, esto le otorgaba una vida media de aproximadamente 17 horas,²⁶ lo que hacía al mensajero una molécula muy estable.

El mensajero de tau en su extremo 3' no traducido posee una secuencia característica de 13 uracilos, donde una proteína estabilizadora HuD se une para formar un complejo de RNA-proteína,^{18, 27} este complejo se ancla a una kinesina, la KIF3A²⁸ para que sea transportado y traducido a nivel del axón.

La localización del mensajero de tau así como su señal de localización/estabilización, resultó muy importante para el entendimiento del mantenimiento de la polaridad neuronal.

Se ha propuesto que durante la enfermedad de Alzheimer la localización de tau podría no ser la adecuada debido a su precipitación en la célula.^{29, 30} Esta precipitación sería dada por un evento de hiperfosforilación,²⁹ lo que podría llevar a una sobre-expresión de tau y provocar que los organelos se acumulasen en ciertos puntos de la neurona.³¹

También se ha mostrado por medio de cultivos celulares el transporte y procesamiento de la APP (proteína precursora amiloide) a lo largo del axón,³² este procesamiento podría provocar que el transporte se viera modificado si APP no se anclara adecuadamente a la proteína kinesina, para su transporte anterógrado.

La expresión de Tau y APP son muy importantes para el óptimo funcionamiento celular, sin embargo estas dos proteínas tienen que ser localizadas subcelularmente en sitios específicos del axón neuronal para que no ocasionen alteraciones del funcionamiento celular.

Para que la proteína tau ejerza su función adecuadamente, varios estudios han demostrado que se requiere de una localización específica^{18, 28} y un adecuado plegamiento,³³ llevado a cabo por proteínas de "stress"³⁴ tales como HSP 70 y 90.³⁵

La proteína precursora amiloidea pertenece a un grupo de polipéptidos

localizados en la membrana celular teniendo una masa molecular de 100 a 140 kDa. En el procesamiento común de la APP intervienen dos proteasas, la α -secretasa y la gamma-secretasa, una tercera enzima, β -secretasa puede participar en el procesamiento de la APP que junto con la α -secretasa pueden generar los péptidos amiloideos.^{36, 37}

El origen de las placas amiloideas y de las marañas neurofibrilares observadas en el córtex temporal es explicado mediante la hipótesis de la cascada amiloidea,³⁸ la cual propone que la acumulación de las placas amiloideas son las responsables de la demencia en la enfermedad. La hipótesis plantea que el péptido amiloideo insoluble generado por la proteólisis de la APP por la β -secretasa, gamma-secretasa activa y especies reactivas de oxígeno son las que promueven la fosforilación de la proteína tau, que a su vez es la responsable de la formación de las marañas neurofibrilares.

En cuanto a la enzima β -secretasa (BACE, por sus siglas en inglés), se ha demostrado que ésta corta en el sitio β de la APP, y es un tipo de aspartil proteasa transmembranal con las características esenciales de β -secretasa, debido a que si se sobre-expresa, eleva los niveles de productos de β -secretasa. El uso de sondas antisentido contra BACE1 genera la disminución de productos de β -secretasa, que está colocalizada a nivel subcelular con la APP.³⁹

La β -secretasa incrementa su expresión en células que son expuestas a estrés oxidativo,⁴⁰ generando activación de las caspasas⁴¹ y una disminución en la degradación de BACE. Se ha observado que cuando la célula se encuentra en apoptosis la proteína permanece estable, en cuanto a su proceso de degradación. Por otro lado, la estabilización fue demostrada en estudios donde se indica que BACE se degrada en los lisosomas con ayuda de GGAs (Golgi-localized gamma-earcontaining ARF-binding proteins).⁴²

Tanto la actividad de la enzima β -secretasa,⁴³ así como estudios de expresión en cultivos celulares han contribuido de una manera precisa al entendimiento de la función de BACE.

Para el caso del estudio de la nicastrina, la cual es una glicoproteína transmembranal tipo I que forma parte del complejo de las gamma-secretasas,⁴⁴ éstas forman un complejo enzimático que requieren de al menos de 4 proteínas adicionales para procesar el péptido en el extremo carboxilo terminal originado por la acción previa de la α -secretasa o la β -secretasa.

La mejor manera de hacer estos estudios es en cultivos celulares, ya que nos permite con cierta libertad manipular las condiciones ambientales del entorno celular.

Ratones transgénicos vs. cultivos celulares.

La EA es muy compleja por eso resulta difícil crear un organismo donde se manifiesten las características de la enfermedad; sin embargo, hasta ahora los ratones generados muestran las marcas principales de la enfermedad.

La mayoría de los ratones generados sobre-expresan APP, presenilinas y tau. El tiempo promedio de vida de un ratón es de 1 año, lo cual hace muy corto el proceso de semejar la enfermedad de Alzheimer. Es claro que tanto ratones como ratas no mueren de enfermedades neurodegenerativas.

Existe un modelo en ratón cuyo promedio de vida es menor al normal y posee un procesamiento anormal de la APP en cerebro,⁴⁵ éste podría ser un buen modelo para estudios de la enfermedad de Alzheimer.

Asimismo, los ambientes controlados nos permiten conocer de manera más exacta, como se están expresando los genes y proteínas a determinados estímulos.

Es el momento de tratar de crear modelos *in vitro* que nos permitan simular la enfermedad de Alzheimer, éstos quizás nos den un mejor entendimiento de cómo la enfermedad de Alzheimer esporádica comienza.

Cuando se hace una búsqueda en el PubMed aparecen alrededor de 2400 referencias donde se utilizaron ratones transgénicos, 412 referencias donde se utilizaron ratones knockout y alrededor de 500

referencias donde se ocuparon cultivos celulares.

Tanto ratas como ratones por su manejo y fácil reproducción son un “modelo” preferido para el estudio de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, uno de los puntos en contra es que estos roedores no presentan enfermedades neurodegenerativas por su corto tiempo de vida, así que definir la enfermedad en un roedor resulta controversial.

¿Cómo definimos la enfermedad de Alzheimer?

¿A partir de estudios post-mortem? o de que otra manera. Hasta ahora solo los estudios en pacientes que han fallecido se puede aplicar la definición de la enfermedad de Alzheimer, y esto es la existencia de placas amiloideas y marañas neurofibrilares.

Por ejemplo, un ratón que sobre-expresa la APP⁴⁶ y que muestra acumulación del péptido amiloideo en el cerebro, pero no presenta marañas neurofibrilares, no es Alzheimer. Estudios llevados a cabo en glioma donde se sobre-expresa tau, muestran una localización alrededor del núcleo y se pierda la asociación a tubulina,⁴⁷ sin embargo, esto tampoco se podría considerar Alzheimer.

2. Conclusión

Hasta ahora hemos visto que no hay un modelo que muestre las características principales que definen a la EA, y estas son: a) que existan placas amiloideas b) que se generen marañas neurofibrilares, c) que haya retracción de neuritas, d) que haya activación de caspasas.

Si podemos demostrar ya sea en un modelo *in vitro* o *in vivo* estas condiciones, entonces podremos decir que tenemos un modelo de la enfermedad de Alzheimer.

3. Agradecimientos

Donativo PROMEP/103.5/07/2753 (PTC-195; LIG); Proyecto CONACYT 106531 (MEH).

4. Bibliografía

1. Bertram L, Tanzi RE. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 768-778.
2. Hardy J. A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron* 2006; 52: 3-13.
3. Zekry D, Duyckaerts C, Moulias R et al. Degenerative and vascular lesions of the brain have synergistic effects in dementia of the elderly. *Acta Neuropathol* 2002; 103: 481-487.
4. Verwer RW, Baker RE, Boiten EF et al. Post-mortem brain tissue cultures from elderly control subjects and patients with a neurodegenerative disease. *Exp Gerontol* 2003; 38: 167-172.
5. von Bohlen Und Halbach O. Modeling neurodegenerative diseases in vivo review. *Neurodegener Dis* 2005; 2: 313-320.
6. Fleming SM, Fernagut PO, Chesselet MF. Genetic mouse models of parkinsonism: strengths and limitations. *NeuroRx* 2005; 2: 495-503.
7. Melrose HL, Lincoln SJ, Tyndall GM, Farrer MJ. Parkinson's disease: a rethink of rodent models. *Exp Brain Res* 2006; 173: 196-204.
8. Tajouri L, Fernandez F, Griffiths LR. Gene expression studies in multiple sclerosis. *Curr Genomics* 2007; 8: 181-189.
9. Mix E, Meyer-Rienecker H, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies - potential and limitations. *J Neurol* 2008; 255 Suppl 6: 7-14.
10. Jackson M, Ganel R, Rothstein JD. Models of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Protoc Neurosci* 2002; Chapter 9: Unit 9.13.
11. Niessen HG, Debska-Vielhaber G, Sander K et al. Metabolic progression markers of neurodegeneration in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 1669-1677.
12. Elson A, Wang Y, Daugherty CJ et al. Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 13084-13089.
13. Herson PS, Virk M, Rustay NR et al. A mouse model of episodic ataxia type-1. *Nat Neurosci* 2003; 6: 378-383.
14. Brudno M, Poliakov A, Salamov A et al. Automated whole-genome multiple alignment of rat, mouse, and human. *Genome Res* 2004; 14: 685-692.
15. Willis-Owen SA, Flint J. The genetic basis of emotional behaviour in mice. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 721-728.
16. Duff K, Suleman F. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: how useful have they been for therapeutic development? *Brief Funct Genomic Proteomic* 2004; 3: 47-59.
17. Jami J. Transgenic mice: a tool for the study of tissue-specific gene expression. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 7-11.
18. Aranda-Abreu GE, Behar L, Chung S, Furneaux H, Ginzburg I. Embryonic lethal abnormal vision-like RNA-binding proteins regulate neurite outgrowth and tau expression in PC12 cells. *J Neurosci* 1999; 19: 6907-6917.
19. Garner CC, Tucker RP, Matus A. Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* 1988; 336: 674-677.
20. Tucker RP, Garner CC, Matus A. In situ localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain. *Neuron* 1989; 2: 1245-1256.

21. Kanai Y, Hirokawa N. Sorting mechanisms of tau and MAP2 in neurons: suppressed axonal transit of MAP2 and locally regulated microtubule binding. *Neuron* 1995; 14: 421-432.
22. Caceres A, Kosik KS. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 1990; 343: 461-463.
23. Kosik KS, Caceres A. Tau protein and the establishment of an axonal morphology. *J Cell Sci Suppl* 1991; 15: 69-74.
24. Caceres A, Potrebic S, Kosik KS. The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J Neurosci* 1991; 11: 1515-1523.
25. Sadot E, Marx R, Barg J, Behar L, Ginzburg I. Complete sequence of 3'-untranslated region of Tau from rat central nervous system. Implications for mRNA heterogeneity. *J Mol Biol* 1994; 241: 325-331.
26. Aronov S, Marx R, Ginzburg I. Identification of 3'UTR region implicated in tau mRNA stabilization in neuronal cells. *J Mol Neurosci* 1999; 12: 131-145.
27. Aronov S, Aranda G, Behar L, Ginzburg I. Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *J Neurosci* 2001; 21: 6577-6587.
28. Aronov S, Aranda G, Behar L, Ginzburg I. Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules. *J Cell Sci* 2002; 115: 3817-3827.
29. Ruben GC, Ciardelli TL, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Alzheimer disease hyperphosphorylated tau aggregates hydrophobically. *Synapse* 1997; 27: 208-229.
30. Trojanowski JQ, Lee VM. The role of tau in Alzheimer's disease. *Med Clin North Am* 2002; 86: 615-627.
31. Shemesh OA, Erez H, Ginzburg I, Spira ME. Tau-induced traffic jams reflect organelles accumulation at points of microtubule polar mismatching. *Traffic* 2008; 9: 458-471.
32. Muresan V, Varvel NH, Lamb BT, Muresan Z. The cleavage products of amyloid-beta precursor protein are sorted to distinct carrier vesicles that are independently transported within neurites. *J Neurosci* 2009; 29: 3565-3578.
33. Shastry BS. Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochem Int* 2003; 43: 1-7.
34. Smith RC, Rosen KM, Pola R, Magrane J. Stress proteins in Alzheimer's disease. *Int J Hyperthermia* 2005; 21: 421-431.
35. Koren Jr, Jinwal UK, Lee DC et al. Chaperone signalling complexes in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 619-630.
36. Buxbaum JD, Thinakaran G, Koliatsos V et al. Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path. *J Neurosci* 1998; 18: 9629-9637.
37. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001; 81: 741-766.
38. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 383-388.

39. Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME et al. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 1999; 402: 533-537.
40. Tong Y, Zhou W, Fung V et al. Oxidative stress potentiates BACE1 gene expression and Aβ generation. *J Neural Transm* 2005; 112: 455-469.
41. Eckert A, Steiner B, Marques C et al. Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation. *J Neurosci Res* 2001; 64: 183-192.
42. Tesco G, Koh YH, Kang EL et al. Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity. *Neuron* 2007; 54: 721-737.
43. Oh M, Kim SY, Oh YS et al. Cell-based assay for beta-secretase activity. *Anal Biochem* 2003; 323: 7-11.
44. Yu G, Nishimura M, Arawaka S et al. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 2000; 407: 48-54.
45. Castillo CA, Albasanz JL, Leon D et al. Age-related expression of adenosine receptors in brain from the senescence-accelerated mouse. *Exp Gerontol* 2009;44:453-461.
46. Howlett DR, Richardson JC. The pathology of APP transgenic mice: a model of Alzheimer's disease or simply overexpression of APP? *Histol Histopathol* 2009; 24: 83-100.
47. de Silva R, Farrer M. Tau neurotoxicity without the lesions: a fly challenges a tangled web. *Trends Neurosci* 2002; 25: 327-329.

Recibido: 15 de junio de 2010

Aceptado: 7 de julio de 2010