

Modelo experimental de enfermedad de Alzheimer esporádica en ratas inducido por la inyección intracerebroventricular de estreptozotocina



INIBIOLP
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata

María F. Zappa Villar, Gustavo R. Morel, Lucía S. Trípodí, Paula C. Reggiani

Cátedra "B" de Citología, Histología y Embriología - INIBIOLP. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.



INTRODUCCIÓN

La **enfermedad de Alzheimer esporádica (EAE)** es la patología neurodegenerativa más frecuente, se acompaña de un progresivo déficit de memoria, deterioro cognitivo y cambios de personalidad. Asimismo, se caracteriza por la formación de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares intraneuronales, degeneración neuronal y alteración del metabolismo energético cerebral. La combinación de un diagnóstico temprano y una terapia efectiva resulta imprescindible para frenar el progresivo aumento de casos dado por la mayor expectativa de vida. Para contribuir a superar esta problemática numerosos modelos animales *in vitro* e *in vivo* están siendo estudiados. Un modelo animal propuesto para el estudio de la EAE consiste en la administración **intracerebroventricular (icv)** de una droga diabotogénica, la **estreptozotocina (STZ)**. En este contexto, nuestro objetivo general es el desarrollo de estrategias terapéuticas de avanzada que nos permitan prevenir y/o subsanar los cambios degenerativos que ocurren en el cerebro con Alzheimer experimental.

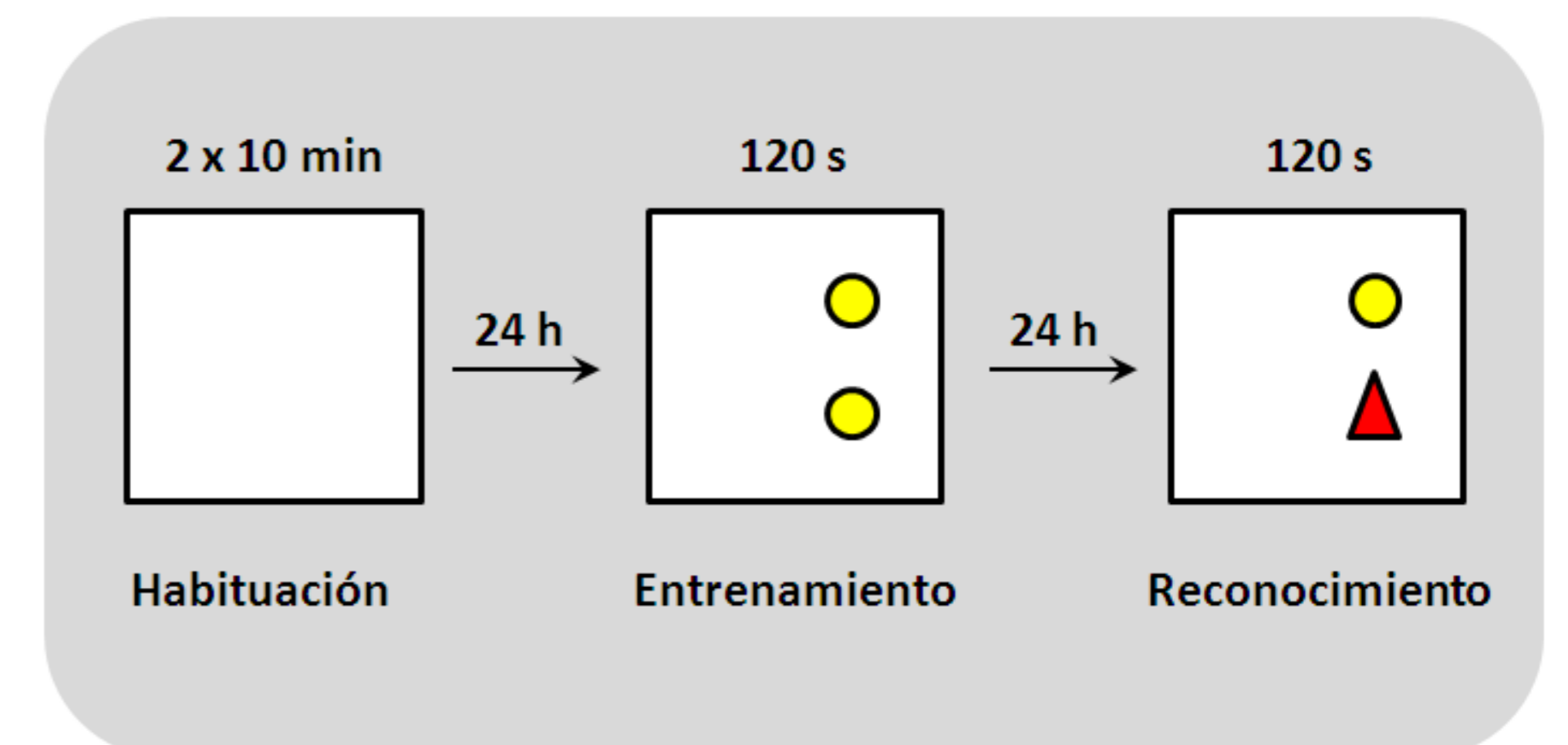
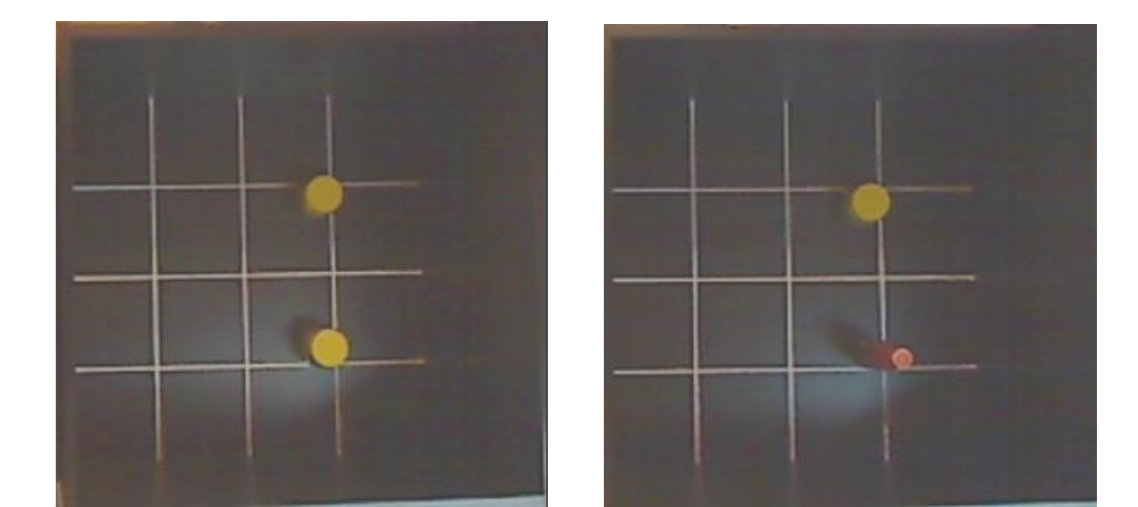
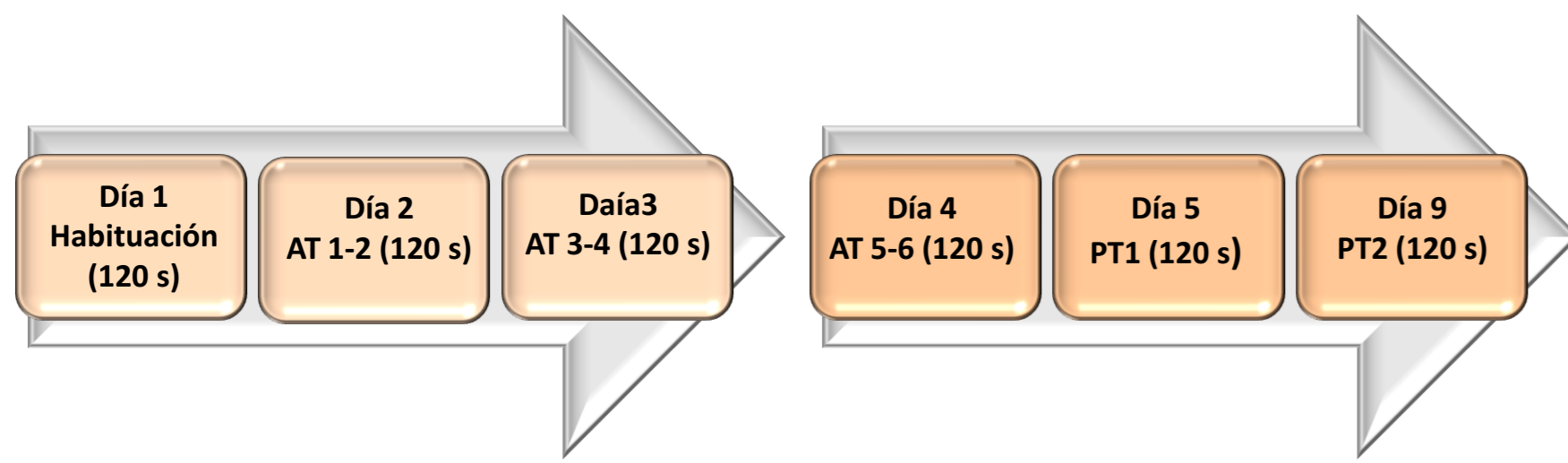
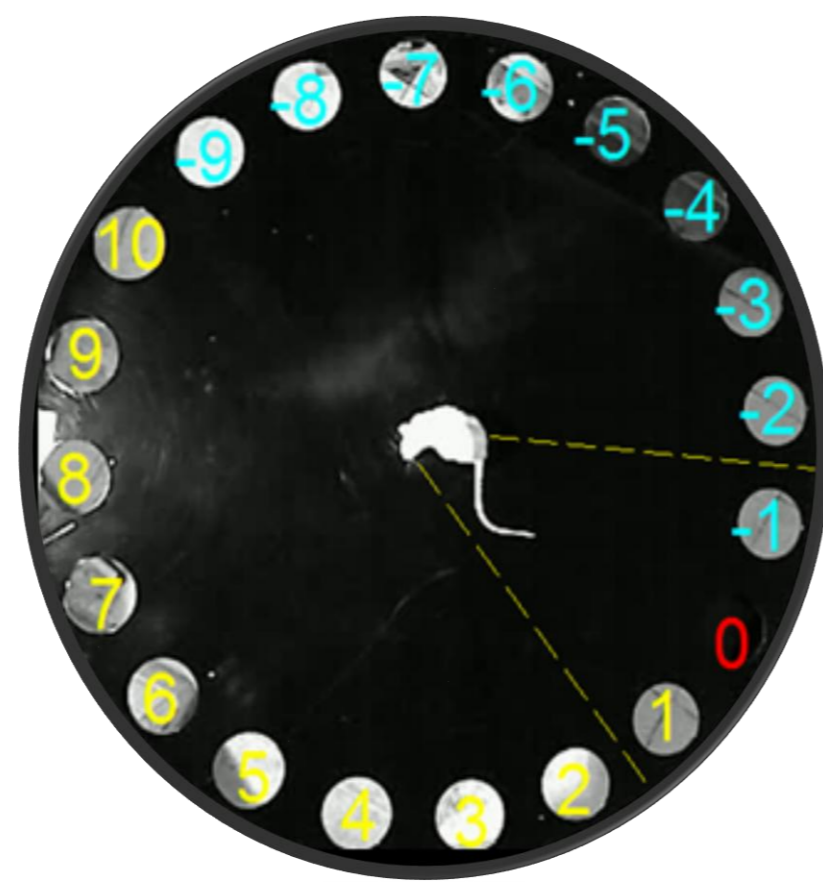
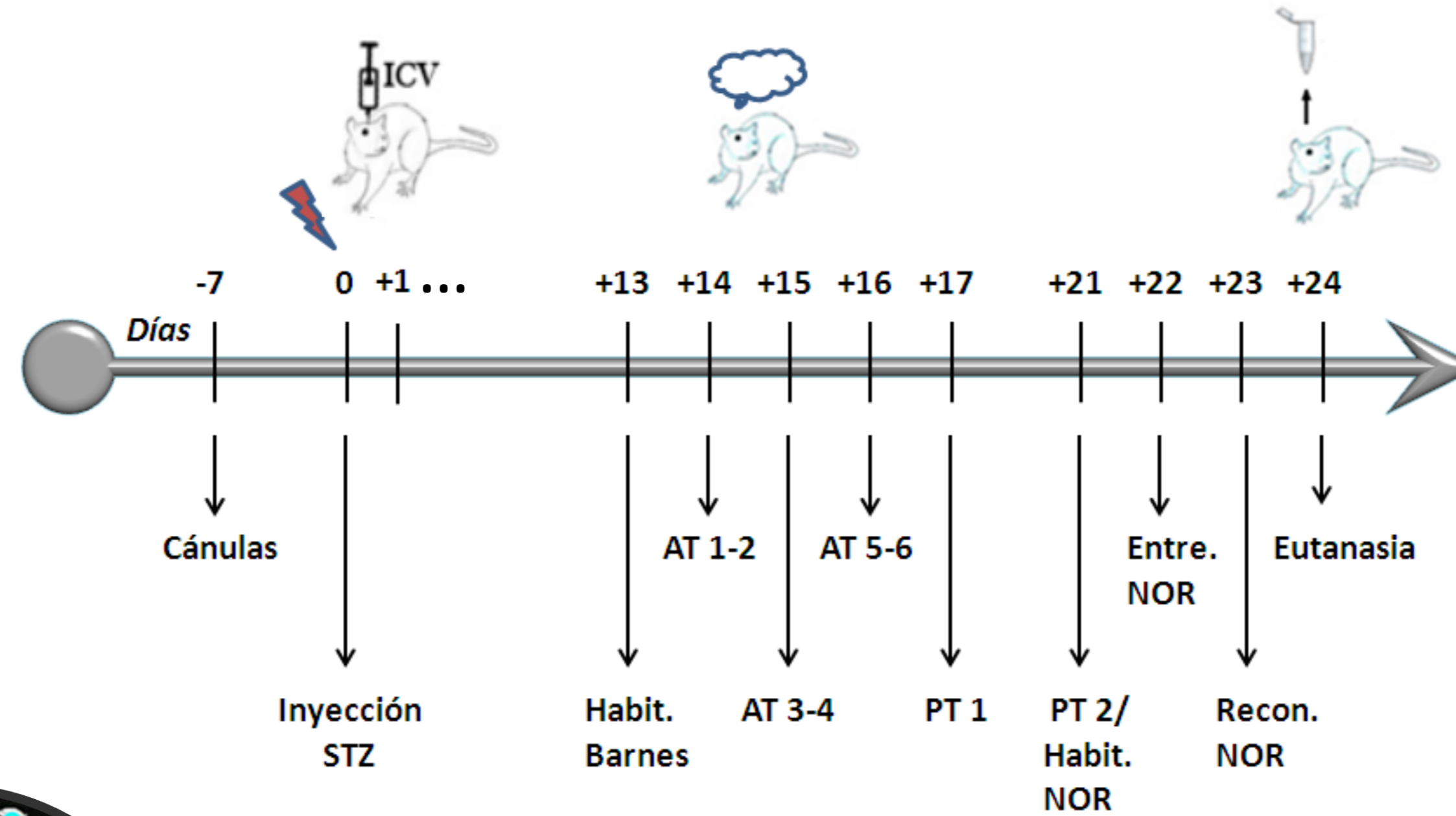
MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo

Nos propusimos poner a punto un modelo de EAE por la administración icv de STZ (STZ-icv) en ratas jóvenes *Sprague Dawley* (SD) machos. Este modelo será utilizado en estudios de terapia génica y celular.

Animales: Se utilizaron ratas SD machos según los siguientes grupos experimentales (n=6/grupo): I- intactas, II- STZ1 y III- STZ3.

Procedimiento quirúrgico y administración STZ-icv: luego de la anestesia con ketamina y xilacina, los animales que recibieron la inyección icv de STZ fueron canulados en los ventrículos laterales según las siguientes coordenadas estereotáxicas respecto del bregma: 0.92 mm antero-posterior, 1.5 mm lateral y 3.9 mm ventral. Una semana después, en el día experimental 0, los animales de los grupos II y III, recibieron una inyección icv a través de las cánulas de 1 o 3 mg/kg de STZ (Sigma) en PBS estéril, respectivamente. El grupo I no recibió inyección icv. En todos los días experimentales se tomó el peso corporal de los animales. Luego de 14 días se evaluó el déficit de aprendizaje y memoria espacial dependiente de hipocampo en el Laberinto de Barnes y la memoria de reconocimiento por el test NOR (Novel Object Recognition). Luego de 24 días se procedió a la eutanasia de los animales.



En el **Laberinto de Barnes** se evalúa cuanto recuerda el animal la localización de una caja de escape que se encuentra debajo de uno de 20 orificios de una plataforma circular de acrílico negro de 122 cm de diámetro, elevada noventa centímetros del suelo. El test consistió en un período de aprendizaje (*acquisition trial*, AT) de tres días con dos ensayos diarios y, un período de prueba (*probe trial*, PT), un día y 5 días después del último AT, en el que se retira la caja de escape del agujero meta. Los parámetros evaluados fueron los siguientes; **Latencia a la meta:** tiempo (en segundos) empleado por un animal desde el cilindro de inicio hasta que ingresa en la caja de escape (durante un AT) o hasta la primera exploración del agujero meta (durante un PT). **Errores:** número de exploraciones en agujeros diferentes al agujero meta. **Frecuencia de exploración de la región meta (Goal Sector 3, GS3):** suma del número de exploraciones en los agujeros -1, 0, y 1, dividido por 3, durante un PT. **Frecuencia de exploración de la región no meta (Non Goal Sector, NGS):** suma del número de exploraciones en los 17 agujeros del NGS, dividido 17, en un PT.

El test NOR evalúa la memoria de reconocimiento; se basa en la preferencia que muestran los animales por el objeto nuevo versus el familiar. Las ratas fueron individualmente habituadas a una arena abierta en el día 1. En el día 2, sesión de **entrenamiento** (120 s), se colocaron dos objetos idénticos en la arena; en el día 3, sesión de **reconocimiento** (120 s), se reemplazó un objeto familiar por uno nuevo, de similares dimensiones pero diferente forma y color. Se cuantificó el tiempo empleado por los animales en la exploración de cada objeto.

RESULTADOS

Evaluación del peso corporal: Los grupos STZ1 y STZ3 mostraron una disminución en el peso corporal respecto del grupo intacto durante todos los días post-inyección de la STZ (Fig. 1).

Evaluación de la memoria: Al final del experimento evaluamos la memoria espacial mediante el **Laberinto de Barnes** y observamos que el grupo STZ3 exploró menos la región meta respecto al grupo intactas, mientras que el grupo STZ1 no mostró diferencias significativas en la exploración respecto a las ratas intactas (Fig. 2.C). Además, los animales STZ3 demoraron más tiempo en encontrar el agujero meta (Fig. 2.A) y exploraron más veces los agujeros no meta, por lo que cometieron más errores (Fig. 2.B). Seguidamente, evaluamos la memoria de reconocimiento mediante el **Test NOR** y observamos una significativa preferencia por el objeto nuevo en el grupo de animales intactos mientras que en los animales que recibieron STZ no mostraron dicha preferencia (Fig. 3).

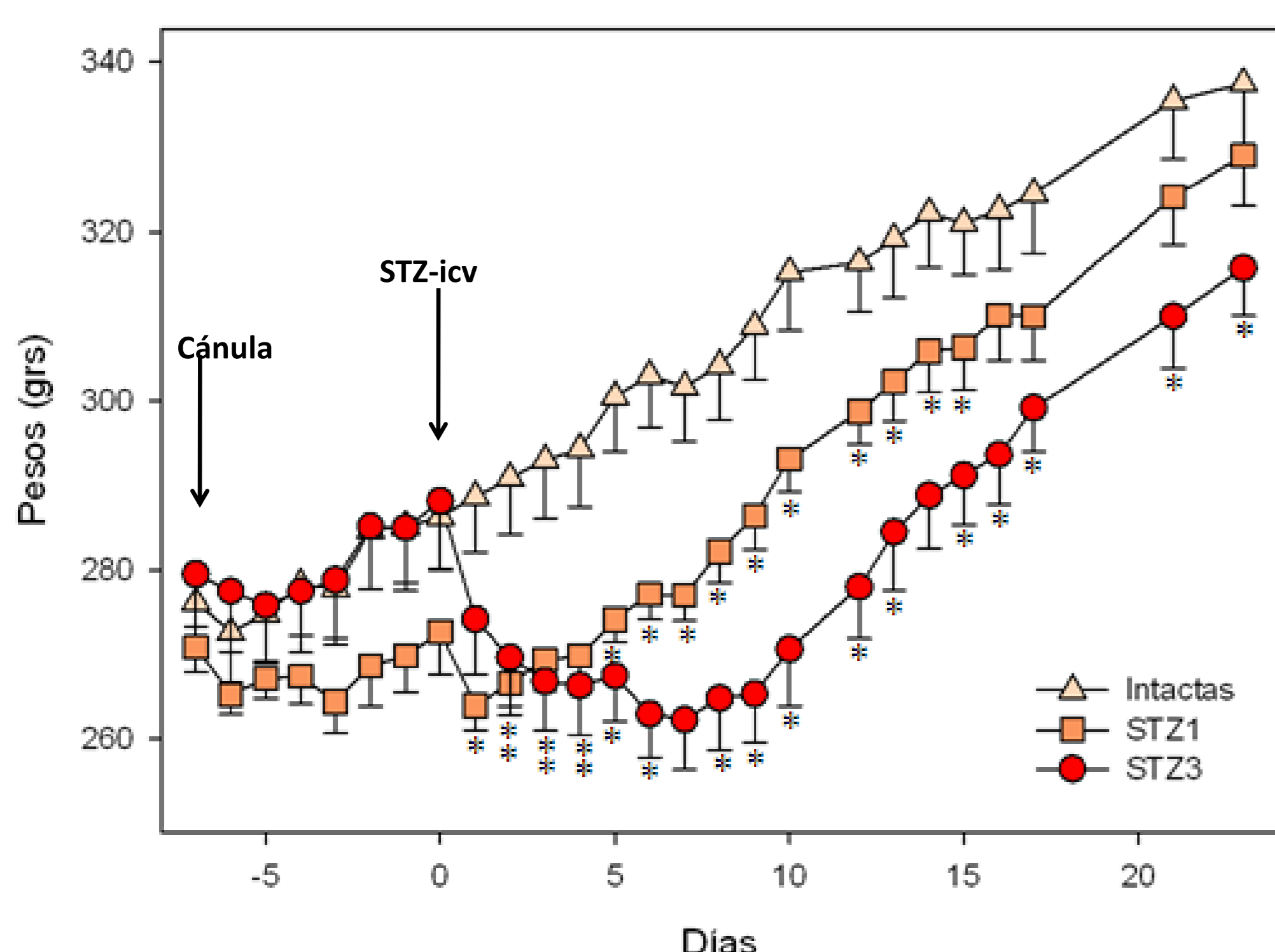
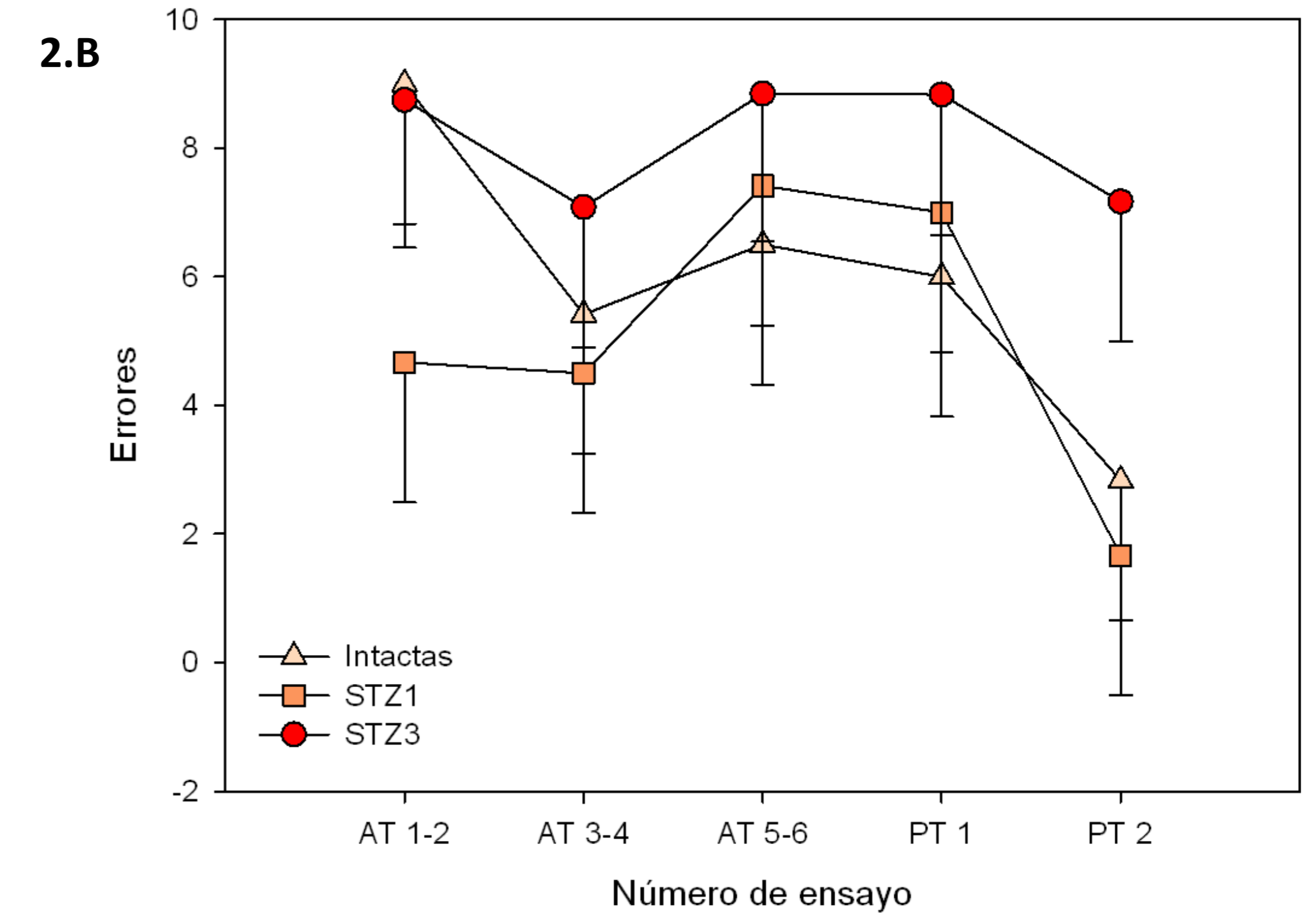
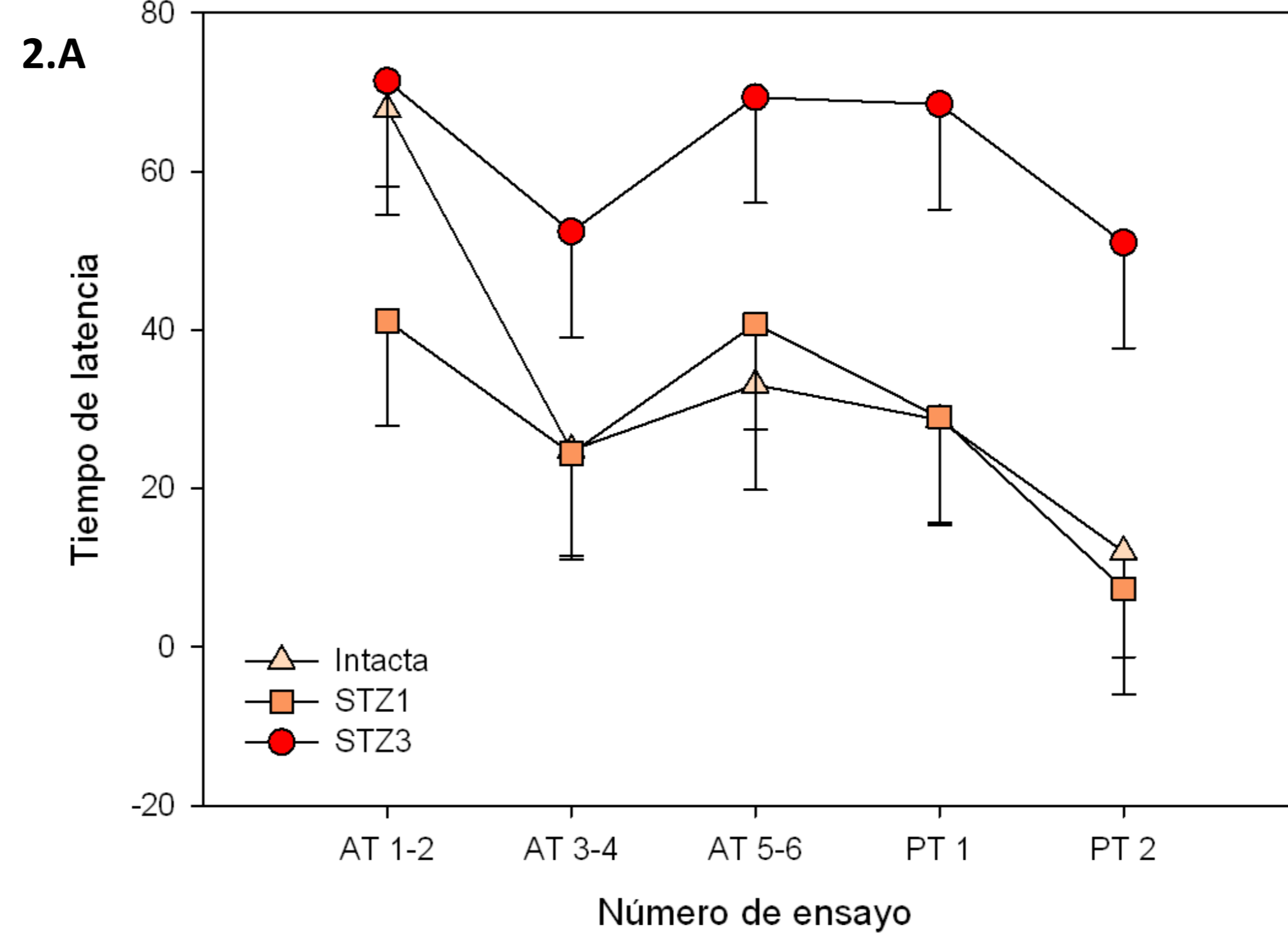


Figura 1: Valores del peso corporal, desde el día experimental -7 al día 23, de los tres grupos evaluados; *(P<0,05); vs. Intactas

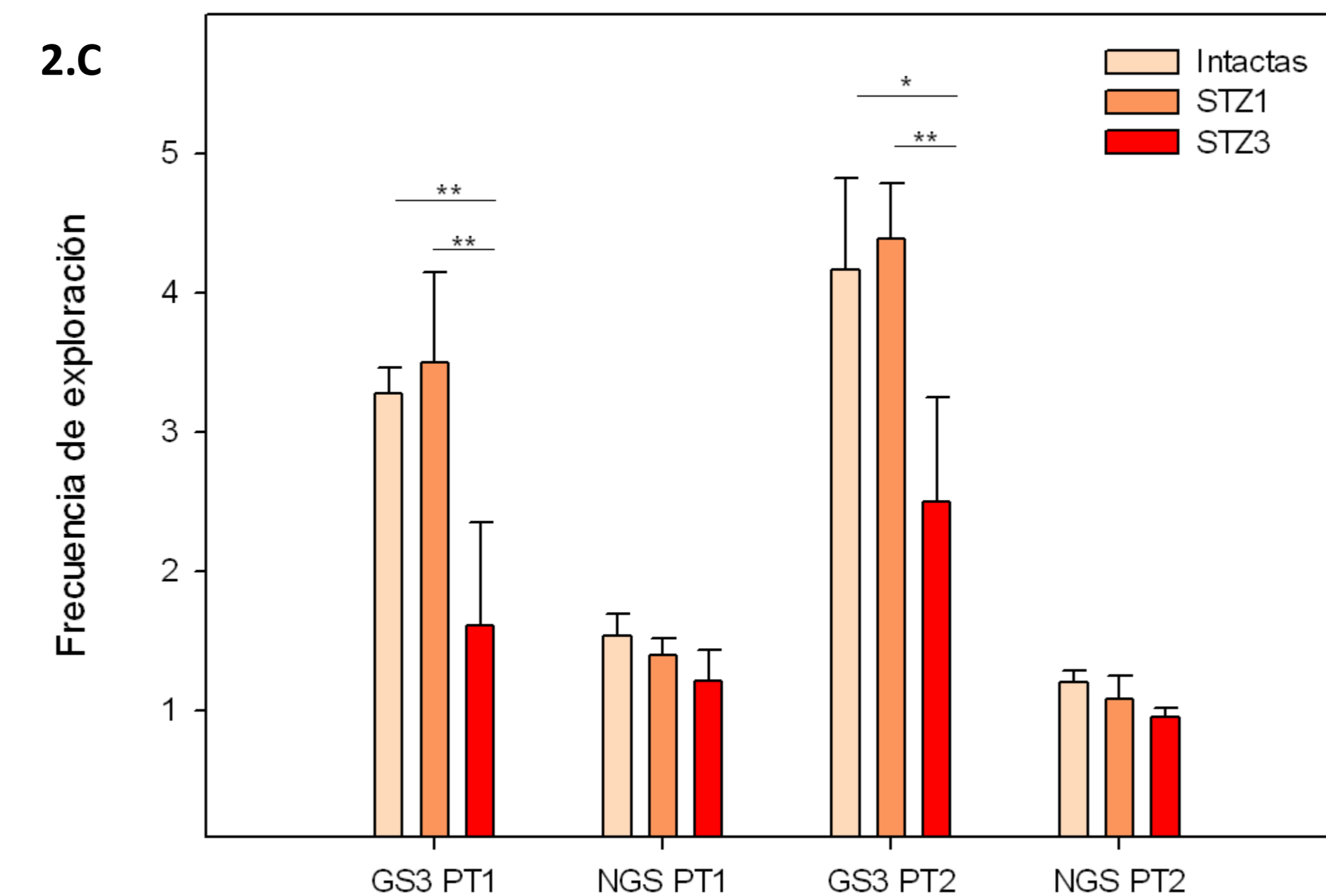


Figura 2: Parámetros evaluados en el Laberinto de Barnes. Se graficaron por día, para los AT y PT, el tiempo de Latencia (segundos que demora el animal hasta encontrar el agujero meta, A) y los Errores que cometen al explorar los agujeros no meta (B); y, en los PT 1 y 2, la Frecuencia de exploración de la Región Meta (GS3) y No Meta (NGS) (C). *(P<0,05); **(P<0,01) vs. Intactas

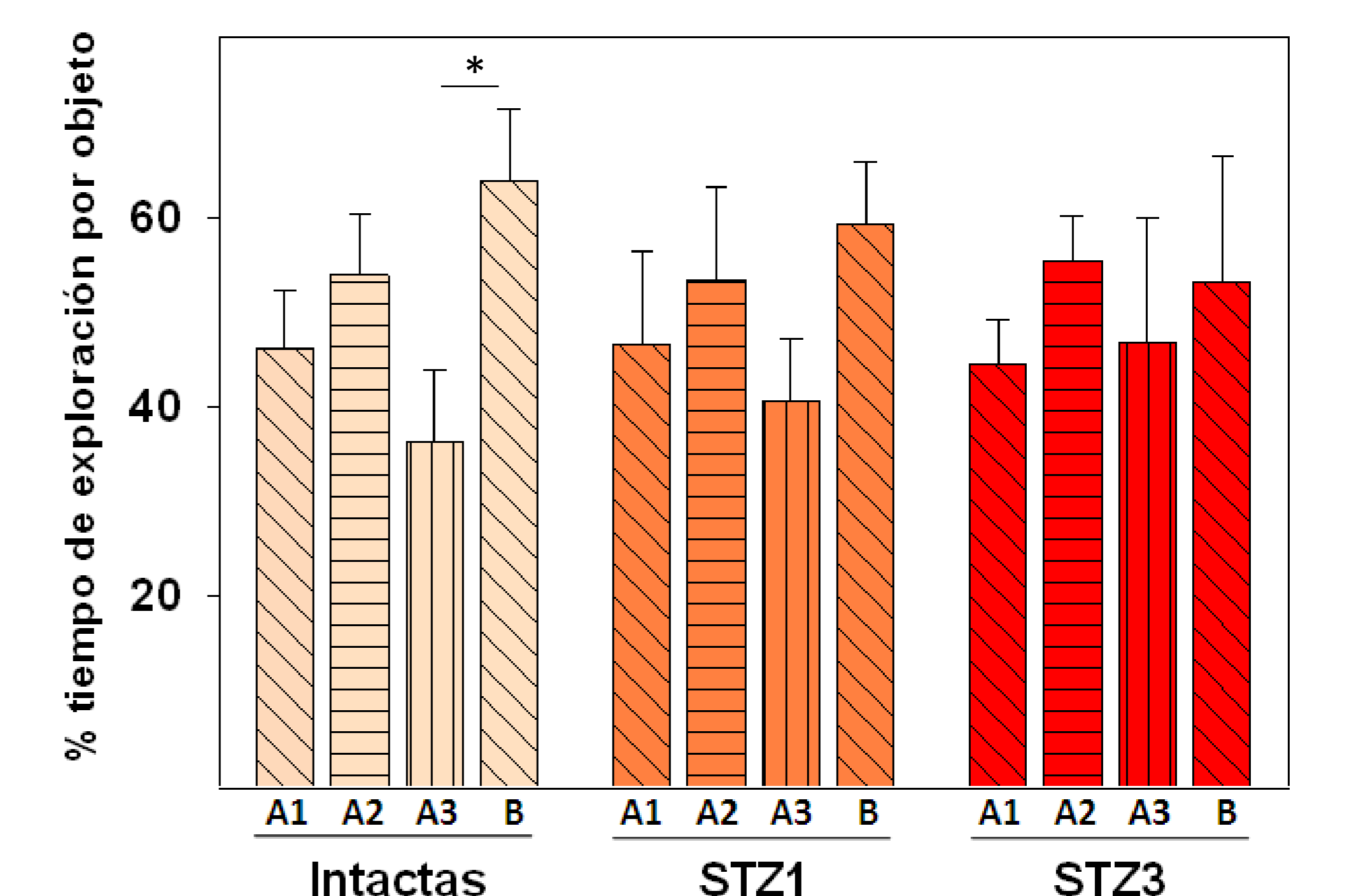


Figura 3: Memoria de reconocimiento evaluada mediante el Test NOR. Las columnas corresponden al tiempo de exploración de los objetos expresado en porcentaje. En la sesión de entrenamiento se registró el tiempo de exploración de A1 y A2 y en la sesión de reconocimiento, 24hs después, se registró A3 (objeto conocido) y B (objeto nuevo). *(P<0,05) A3 vs. B

Conclusión

Se observó un déficit cognitivo significativo en los animales que recibieron la dosis de STZ de 3 mg/kg de peso. Por lo tanto, dicha dosis es la más adecuada para generar el modelo de EAE en nuestros animales.