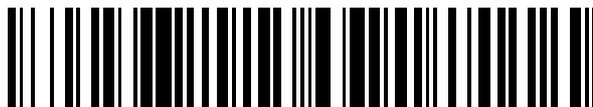


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 921**

21 Número de solicitud: 201231533

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

05.10.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.05.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070693

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE
(50.0%)**

**Avda. de Córdoba, s/nº - Hospital Universitario 12
de Octubre, Centro de actividades ambulatorias,
6ª planta, Bloque D
28041 Madrid ES y**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED DE ENFERMEDADES
NEURODEGENERATIVAS (CIBERNED) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CARRO DÍAZ, Eva María;
ANTEQUERA TIENDA, Desiree y
PASCUAL PÉREZ, Consuelo**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MODELO ANIMAL DE DÉFICIT COGNITIVO, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y
APLICACIONES**

57 Resumen:

Modelo animal de déficit cognitivo, procedimiento de obtención y aplicaciones.

La invención se refiere a un modelo animal de déficit cognitivo el cual presenta ausencia de megalina específicamente en el endotelio de los capilares cerebrales, así como a su procedimiento de obtención y a su uso como modelo de enfermedades neurodegenerativas, más concretamente en Alzheimer.

ES 2 458 921 A1

DESCRIPCIÓN

Modelo animal de déficit cognitivo, procedimiento de obtención y aplicaciones

La presente invención se encuadra en el campo de la biotecnología. Específicamente se refiere al desarrollo de animales no humanos útiles como modelos de enfermedades humanas relacionadas con déficit cognitivo, y más específicamente como modelo de Alzheimer.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La enfermedad de Alzheimer es una de las enfermedades que mayor importancia presenta en la investigación biomédica. Se trata de una de las enfermedades neurodegenerativas que más impacto tiene en la sociedad. Esta enfermedad provoca un deterioro cognitivo del paciente, y puede acabar desarrollándose de tal forma que puede llevar a la muerte del paciente. Debido al progresivo envejecimiento de la población en los países industrializados, la tasa de mortalidad debida a esta enfermedad se encuentra en ascenso. La existencia de un bajo número de fármacos útiles ha provocado un gran desarrollo del número de investigaciones realizadas en aras de conocer la etiopatogénesis de la enfermedad. Además, se ha aumentado el número de compuestos ensayados con la intención de encontrar tratamientos para la enfermedad. Sin embargo, en la actualidad sigue siendo necesaria la investigación en mayor profundidad de los mecanismos etiopatológicos que conlleva la enfermedad, y la búsqueda de fármacos que permitan una remisión de la enfermedad y una mejora en la calidad de vida de los pacientes.

Para el estudio de la enfermedad y de fármacos útiles para su tratamiento o para la atenuación de síntomas, se hace necesaria la búsqueda de modelos animales que reproduzcan las características de la enfermedad presentes en la enfermedad en seres humanos. Para ello se han desarrollado diferentes modelos animales como por ejemplo diversos animales transgénicos portadores de las distintas mutaciones encontradas en pacientes de Alzheimer familiar, tales como presenilinas y β amiloide (Hock & Lamb, 2001, *Trends Genet.* 17(10):S7-12.). Un inconveniente muy importante es que si bien estos animales mutantes presentan varios de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer, ninguno de ellos exhibe todo el espectro de cambios patológicos asociados a la misma (Richardson *et al.*, 2002, *ILAR J.* 43(2):89-99). En un intento de solucionar este problema se han cruzado entre sí cepas de ratones transgénicos con las distintas mutaciones que recrean cada una de ellas distintos aspectos de la enfermedad para así lograr un modelo que se asemeje mejor a la patología humana (Phinney *et al.*, 2003, *Neurol Res.* 25(6):590-600).

A pesar de estos esfuerzos, aun resulta necesaria la elaboración de nuevos modelos que permitan estudiar las enfermedades neurológicas desde diferentes enfoques y analizando la implicación de diferentes elementos.

Por otro lado se ha comprobado que la megalina/LRP2, miembro de la familia de genes receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL), está implicada en la captación celular de diversas macromoléculas, incluyendo numerosos factores neurotróficos vitales para el normal funcionamiento del cerebro. La megalina, también conocida como LRP-2 y glicoproteína 330, es el mayor miembro de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), que también incluye VLDLR, ApoER2/LRP8, LRP1, LRP1B, SorLA/LR11, LRP5, LRP6 y MEGF7 (Jaeger y Pietrzik, 2008, *Curr Alzheimer Res* 5(1):15-25; May *et al.*, 2007, *Ann Med* 39(3):219-28). La megalina se expresa en varios epitelios absorbentes, incluyendo túbulos proximales renales, vesícula vitelina visceral, borde de cepillo intestinal, células foliculares de tiroides, epidídimo, tractos reproductivos masculinos y femeninos y epitelio del oído interno (Christensen y Birn, 2002, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(4):256-66; Argraves y Morales, 2004, *Mol Reprod Dev* 69(4):419-27; Moestrup y Verroust, 2001, *Annu Rev Nutr* 21:407-28; Van Praet, 2003, *Mol Reprod Dev* 64(2):129-35).

En el sistema nervioso central (CNS) la megalina fue descrita por primera vez en los capilares del cerebro, revestimiento ependimario de las paredes ventriculares y plexos coroideos (Zlokovic *et al.*, 1996, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(9):4229-34; Zheng y Zhao, 2002, *Methods Mol Biol* 188:99-114; Chun *et al.*, 1999, *Exp Neurol* 157(1):194-201; Kounnas *et al.*, 1994, *In Vivo* 8(3):343-51) y más tarde en progenitores neuronales en la médula espinal de embriones de ratón (Wicher *et al.*, 2005, *J Comp Neurol* 492(2):123-31) y oligodendrocitos de médula espinal de ratón postnatal (Wicher *et al.*, 2006, *J Neurosci Res* 83(5):864-73). Más recientemente, la megalina ha sido descrita en astrocitos (Bento-Abreu *et al.*, 2008, *J Neurochem* 106(3):1149-59), cultivo de neuronas granulares del cerebelo (Ambjørn *et al.*, 2008, *J Neurochem* 104(1):21-37), neuronas sensoriales (Fleming *et al.*, 2009, *J Neurosci.* 29(10):3220-32) y neuronas corticales (Chung *et al.*, 2008, *J Biol Chem.* 283(22):15349-58; Alvira-Botero *et al.*, 2010, *Mol Cell Neurosci.* 45(3):306-15).

El análisis de animales deficientes de megalina reveló graves anomalías en el desarrollo de los riñones, pulmones y CNS, consistente con el patrón de expresión de la proteína. Este fenotipo es consistente con el papel de la megalina como receptor endocítico que media la captación celular de nutrientes esenciales, posiblemente derivado de lipoproteínas de colesterol, del líquido amniótico en la rápida división del neuroepitelio antes del establecimiento de un sistema circulatorio completo en el embrión (Willnow *et al.*, 1996, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(16):8460-4).

Por ello, la implicación de esta proteína en enfermedades no ha podido ser estudiado ya que los animales deficientes en ella no presentan un correcto desarrollo y presentan graves anomalías en el desarrollo de diversos tejidos.

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se enfrenta a la necesidad de encontrar modelos animales de enfermedades neurodegenerativas que permitan el estudio etiotológico de estas enfermedades, así como a la necesidad de modelos que permitan el análisis de fármacos para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad humana.

En la presente invención los inventores demuestran como mediante la eliminación de la expresión de megalina (LRP-2) específicamente en el endotelio de los capilares cerebrales de animales no humanos, se obtiene un modelo animal que presenta déficit cognitivo, y que reproduce comportamientos similares a enfermedades humanas que cursan con déficit cognitivo como por ejemplo el Alzheimer. Mediante el sistema Cre/lox bajo el promotor Tie2, un promotor específico de células endoteliales, y dado que la megalina en el endotelio se expresa exclusivamente en los capilares cerebrales, se consigue eliminar la presencia de megalina de forma específica en estos capilares cerebrales, mientras sigue estando presente en los demás tejidos que la expresan de forma habitual. El modelo así generado, tal y como se muestra en los ejemplos, presenta alteraciones comportamentales similares a los de otros modelos previamente descritos como por ejemplo las de modelos de amiloidosis. La eliminación de megalina se ha de realizar de forma exclusiva en el endotelio de los capilares cerebrales ya que en caso contrario, dado que la megalina es un receptor presente en diversos tejidos, se producirían otros defectos en el animal generado de forma que no presentaría la misma utilidad que en la presente invención. Además, la ausencia de megalina en todos los tejidos puede provocar que no se produzca el correcto desarrollo de estos tejidos o del animal lo que puede provocar la muerte prematura del mismo por defectos en el desarrollo y por tanto que no sea posible por ejemplo el uso de animales adultos o de estudios que necesiten tiempos de espera largos, como por ejemplo el análisis de los efectos de fármacos. Además las deficiencias en el desarrollo de estos tejidos provocan que los animales con ausencia de megalina en tejidos diferentes a los capilares vasculares presenten utilidades diferentes al modelo de la presente invención. Como se muestra en los ejemplos, el modelo de la invención el animal puede llegar a la edad adulta, y por ello presenta utilidad para los estudios comportamentales o para la identificación y/o evaluación de compuestos o composiciones para la prevención o el tratamiento de enfermedades relacionadas con un déficit cognitivo.

La ausencia de megalina presenta como ventaja frente a otros métodos de inhibición de la proteína o de bloqueo funcional que no existe un posible efecto residual de la parte de la proteína que no sea bloqueada y que compense la falta de actividad de la proteína y por tanto enmascare los efectos del bloqueo o la inhibición.

Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a un modelo animal no humano, de ahora en adelante modelo animal de la invención, caracterizado por la ausencia de megalina localizada específicamente en el endotelio de los capilares cerebrales.

Se entiende por "ausencia de megalina localizada específicamente en el endotelio de los capilares cerebrales" la ausencia de megalina en este tejido mientras la megalina se sigue encontrando expresada en el resto de los tejidos que la presentan de forma habitual, incluyendo por ejemplo, a nivel cerebral: células epiteliales de plexos coroides, neuronas y astrocitos y a nivel extracerebral: células epiteliales de túbulos proximales del riñón, saco visceral vitelino, borde de cepillo intestinal, las células foliculares tiroideas, epidídimo, tractos reproductivos masculinos y femeninos y epitelio del oído interno.

En la presente invención los términos "megalina", "LRP-2", "glicoproteína 330" o "gp330", se refieren a la misma proteína y son intercambiables.

El modelo de la invención presenta mayor utilidad cuando el modelo es un mamífero no humano ya que presenta unas características más similares a las de la enfermedad humana que en otros tipos de animales. Por tanto en una realización preferida del primer aspecto de la invención el animal no humano es un mamífero no humano.

De la misma forma que en el caso anterior, dada la proximidad filogenética de los primates al ser humano, estos animales resultan un mejor modelo para la reproducción de las enfermedades producidas en humanos. Por otro lado, los modelos animales más extendidos para el estudio de enfermedades son aquellos realizados en roedores, principalmente en ratas y ratones. Esto se debe fundamentalmente a la reducción de espacio que suponen estos animales frente otros de mayor tamaño, a la facilidad de cría y manejo de los mismos y a la facilidad de obtención de un elevado número de individuos para su uso. Por todo ello, en una realización más preferida de este aspecto de la invención, el mamífero no humano es un roedor o un primate. En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención, el mamífero no humano es un ratón.

El modelo de la invención puede tener cualquier fondo genético, aunque es ventajoso que dicho animal sea un animal normal que no presente patologías diagnosticadas.

El término "normal", aplicado a animal, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a animales que carecen de transgenes o alteraciones genéticas que podrían estar implicadas en la etiopatogenia de enfermedades neurodegenerativas.

5 Para dar lugar a una ausencia de megalina, la eliminación se puede llevar a cabo mediante un proceso de transgénesis de forma que no permita la expresión del gen *LRP-2* (*low density lipoprotein receptor-related protein 2*) o *megalina* en los capilares cerebrales. Este proceso se puede llevar a cabo por ejemplo, aunque sin limitarse, como se ilustra en los ejemplos de la presente invención, mediante el sistema Cre/lox bajo un promotor específico de tejido, en este caso de células endoteliales como es el promotor Tie-2. Mediante este sistema, y dado que la megalina en el endotelio vascular únicamente se expresa en los capilares cerebrales, se permite la eliminación de la megalina en estos capilares sin afectar al resto de tejidos en los que se encuentra expresada. Por tanto, los animales así generados presentarán ausencia de megalina en los capilares cerebrales, manteniendo la expresión de esta proteína en el resto de tejidos en los que se expresa en un animal normal como por ejemplo, por ejemplo, células epiteliales de plexos coroideos, neuronas, astrocitos, células epiteliales de túbulo proximal del riñón, saco visceral vitelino, borde de cepillo intestinal, las células foliculares tiroideas, epidídimo, tracto reproductivos y/o epitelio del oído interno. Por todo ello, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, el animal no humano es un animal transgénico.

20 Como se demuestra en los ejemplos, los animales con ausencia de megalina específicamente en el endotelio vascular, presentan un déficit cognitivo frente a animales sin esta ausencia. Además estos animales tienen síntomas comunes y características comportamentales similares a modelos de diversas enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo, aunque sin limitarse, Alzheimer, demencia vascular, deterioro cognitivo leve o Parkinson. Por tanto el modelo animal no humano de la presente invención presenta utilidad como modelo experimental de enfermedad neurodegenerativa. Por ello, una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un modelo animal no humano de déficit cognitivo caracterizado por la ausencia de megalina localizada específicamente en el endotelio de los capilares cerebrales útil como modelo experimental de una enfermedad neurodegenerativa. Una realización más preferida se refiere a un modelo animal no humano de déficit cognitivo caracterizado por la ausencia de megalina localizada específicamente en el endotelio de los capilares cerebrales útil como modelo experimental de una enfermedad neurodegenerativa, donde la enfermedad neurodegenerativa es Alzheimer.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la obtención del modelo animal de la invención, de ahora en adelante procedimiento de la invención, el cual comprende la eliminación de megalina específicamente en el endotelio de los capilares cerebrales.

35 La eliminación de megalina se puede producir por ejemplo, aunque sin limitarse mediante transgénesis de forma que se produce una inhibición de la expresión de megalina en el endotelio de los capilares cerebrales de forma específica, sin que afecte a células de otros tejidos donde también se da la expresión del gen. De esta forma se puede obtener el modelo animal de la invención. Por ello en una realización preferida del método de la invención, la eliminación de megalina se produce mediante transgénesis.

40 Tal como se utiliza en la presente invención el término "transgénesis" se refiere a cualquier técnica o procedimiento que permita la integración en una serie de células de un organismo vivo de un gen exógeno, o "transgén", sin afectar a la totalidad de las células de dicho organismo, y que confiere a dichas células y al organismo que las porta una nueva propiedad biológica. Dicho transgén o gen exógeno se refiere a un ADN normalmente no residente, ni presente en la célula que se pretende transformar.

50 El modelo de la invención se puede ser obtenido mediante diferentes estrategias de transgénesis conocidas por el experto. Sin embargo, resulta deseable que el proceso pueda ser un proceso controlado para permitir una mejor consecución del modelo así como un mejor uso del animal. De esta forma, tal y como se demuestra en los ejemplos de la invención, una de las posibles estrategias a utilizar es el uso del sistema "Cre/lox" controlado por un promotor específico de tejido. Por ejemplo, aunque sin limitarse, se puede obtener el modelo de la invención mediante el cruce de animales que presentan sustituida la secuencia de Megalina endógena por la secuencia de Megalina flanqueada por las secuencias lox, con animales que tengan a la recombinasa bacteriana Cre dirigida por un promotor específico del tejido endotelial como por ejemplo el promotor Tie-2. De esta forma, en el tejido endotelial se expresa la recombinasa Cre, y por tanto únicamente los capilares cerebrales que es donde se expresa la megalina, presentarán ausencia de la expresión de la proteína mientras que en el resto de tejidos está expresión no se verá afectada. Por ello, en una realización más preferida del método de la invención, la eliminación de megalina se produce mediante transgénesis por el sistema Cre/lox. En una realización aun más preferida el sistema Cre/lox se encuentra controlado por el promotor Tie2.

60 Tal y como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, el modelo de la invención reproduce los comportamientos que se producen en enfermedades en las que existe un déficit cognitivo asociado a demencia. Debido a esto, este modelo resulta útil para el estudio de enfermedades que cursan con déficit cognitivo, como por ejemplo, aunque sin limitarse, diferentes enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, demencia vascular, deterioro cognitivo leve o Parkinson. Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del modelo de la invención para el estudio de una enfermedad neurodegenerativa. En una realización preferida, la enfermedad

neurodegenerativa es una enfermedad neurodegenerativa humana. En una realización más preferida, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

Por otro lado, debido al comportamiento del modelo animal de la invención, el modelo también resulta útil para la identificación de compuestos útiles para el tratamiento de estas enfermedades. Este modelo animal, al desarrollar síntomas comunes con dichas enfermedades, serían de utilidad para probar nuevos fármacos, la evolución de tratamientos farmacológicos, efectos secundarios de los mismos, y todas aquellos aspectos relativos a ensayos preclínicos. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del modelo de la invención para la identificación y evaluación de compuestos terapéuticos frente a una enfermedad neurodegenerativa. En una realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad neurodegenerativa humana. En una realización más preferida, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Muestra la expresión de megalina en ratones EMD (*Endotelial Megalin Deficient*, o deficientes en megalina en los capilares cerebrales), ratones *Wild-Type* y en diferentes tejidos. A) Mediante inmunohistoquímica se observa expresión de megalina en las células endoteliales en los cerebros de ratones *Wild-Type* (WT), y ausencia en ratones EMD. Las flechas señalan la expresión de megalina. B) Se observa expresión de megalina, determinada por western blot, en lisado de células endoteliales procedentes de ratones WT y no en ratones EMD. Como control positivo se utilizó la línea de células endoteliales cerebrales b.End3. Se utilizó β -actina como control de carga. C) La expresión de megalina está preservada en las células epiteliales de los plexos coroideos, tanto en los ratones salvajes (controles), como en los ratones EMD.

Fig. 2. Análisis de la alteración del comportamiento en los ratones. A) Test del campo abierto. B) Test del reconocimiento de objetos. C) En el test del laberinto en T. En los tres casos, EMD: ratones deficientes en megalina en los capilares cerebrales; Wt: ratones normales; APP: ratones transgénicos APP695 modelo de amiloidosis; APP/Ps1: ratones dobles transgénicos APP695 y Ps1, modelo de amiloidosis.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que ponen de manifiesto la efectividad del modelo de la invención como modelo animal de déficit cognitivo, así como la utilidad del método de generación del mismo. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1. Generación de los ratones transgénicos deficientes en megalina

Para llevar a cabo el modelo de la invención se ha usado el sistema de recombinación Cre/lox (Sauer & Henderson, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85,5166–5170; Sauer, 1993, Methods Enzymol. 225, 890–900) para eliminar el gen de la megalina exclusivamente en los capilares cerebrales. La técnica en este caso, consistió en el cruce de animales con secuencias transgénicas Lox–Megalina que sustituyan a la secuencia Megalina endógena, con animales que tengan a la recombinasa bacteriana Cre dirigida por un promotor específico de tejido, en este caso el de Tie2, específico de endotelio capilar. Para ello se generaron a) ratones transgénicos Tie2-Cre (ratones que presentan el gen *cre* que codifica para la recombinasa Cre bajo el control del promotor Tie-2) y b) ratones transgénicos deficientes de megalina/gp330 (megalina lox/lox) los cuales se cruzaron. Como consecuencia de este cruce se generaron ratones Tie2-Cre/megalina lox/lox, a los que se les llamó ratones EMD (*Endotelial Megalin Deficient*, o deficientes en megalina en los capilares cerebrales) que presentan ausencia de la expresión de megalina en el endotelio de los capilares cerebrales. Los ratones Lox+/+ (que no expresan Cre recombinasa) hermanos de camada fueron utilizados como controles.

Al final de los experimentos, los animales fueron anestesiados con isoforano y perfundidos por vía transcardíaca con paraformaldehído en tampón fosfato (0,1M, pH 7,4) al 4% para posteriores análisis inmunohistoquímicos. Todos los animales fueron manejados en conformidad con la Directiva 2010/63/UE, de 22 de septiembre de 2010.

Un análisis inmunohistoquímico fue usado para comprobar que el sistema experimental bloqueaba la expresión de la proteína megalina en la microvasculatura cerebral. Para ello se incubaron secciones de cerebro de ratones EMD y controles, previamente perfundidos con paraformaldehído, con un anticuerpo primario de cabra anti-megalina (Santa Cruz Biotechnology) y se revelaron con un anticuerpo secundario fluorescente (anti-cabra AlexaFluor488, Molecular Probes). El análisis con microscopía confocal de las células endoteliales cerebrales demostró una expresión

diferencial megalina en ratones EMD en comparación con ratones controles. Utilizando doble tinción de megalina con la lectina, un marcador endotelial, encontramos expresión de megalina en el endotelio de los vasos capilares cerebrales en ratones controles mientras que no se detectó señal de megalina en estas células endoteliales en ratones EMD (Figura 1A). En paralelo, utilizando el mismo procesamiento histológico y con las mismas secciones cerebrales de ratones EMD y controles, se observó que la expresión de megalina se conserva en las células epiteliales de los plexos coroideos tanto en ratones controles como en ratones EMD (Figura 1C).

EJEMPLO 2. Cultivo primario de células endoteliales de la microvasculatura cerebral de ratón

Las células endoteliales de la microvasculatura cerebral (BMECs) fueron aisladas y cultivadas como se ha descrito anteriormente (Jaeger *et al*, 2009, *J Alzheimers Dis.* 17(3):553-70). Brevemente, en un experimento se aislaron cortezas cerebrales de ratones EMD de 8 semanas de edad y en un experimento paralelo se aislaron las cortezas cerebrales de los ratones controles de 8 semanas de edad. Los extractos cerebrales se limpiaron de meninges y trocearon con ayuda de un bisturí. El homogeneizado resultante fue digerido con collagenasa (1 mg/mL) y DNasa (30 U/mL) en medio DMEM (que contiene 100 de unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, 50µg/mL de gentamicina y 2 mM GlutaMAX-I) a 37 ° C durante 40 minutos. Después de la digestión, se añadió 20% albúmina sérica bovina disuelta en DMEM, la muestra se centrifugó a 1.000 × g durante 20 minutos, el sobrenadante que contiene las neuronas y células gliales fue eliminado y el pellet que contiene los capilares se volvió a digerir a 37 ° C durante 30 minutos con collagenasa (1 mg/mL) y DNasa I (30 U/mL) en DMEM). Después de la segunda digestión enzimática, el pellet separado en un gradiente de Percoll al 33% y se centrifugó a 1.000 × g durante 10 minutos para separar los capilares. Los capilares obtenidos fueron lavados por resuspensión en DMEM y centrifuga a 1.000 × g durante 10 minutos. El precipitado rico en microvasos fue resuspendido en DMEM y la mezcla se sembró en placas de cultivo previamente recubiertas con un tampón de recubrimiento compuesto por fibronectina (0,05 mg/mL), colágeno I (0,05 mg/mL) y colágeno IV (0,1 mg/mL). Las células sembradas se incuban a 37 ° C durante 24 horas en un ambiente de humedad (5% CO₂/95% aire) en una mezcla 1:1 de DMEM y una mezcla de nutrientes F12 (DMEM/F-12) que ha sido complementada con 20% de derivados de plasma bovino, penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL) y factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF, 1 ng/mL). Para eliminar otras células contaminantes, pericitos y células gliales, las BMECs fueron tratadas con puromicina (4 µg/mL) durante los 2 primeros días de cultivo. El medio de cultivo fue cambiado cada día. Después de 7 días en cultivo, cuando las BMECs normalmente alcanzan el 80-90% de confluencia, las células fueron fijadas para el análisis de inmunocitoquímica o homogeneizadas para determinaciones por inmunoblot.

A continuación, se comprobó la eficacia del sistema experimental en cultivos primarios de células endoteliales de capilares cerebrales (BMVEC) de ratón. Como se observa en la Figura 1B, la expresión de megalina determinada por western blot es prácticamente inexistente en el lisado celular de BMVEC procedentes de los ratones EMD en comparación con la señal observada en lisados de BMVEC de ratones controles. Como control positivo hemos utilizado una línea de células endoteliales cerebrales (b.End3) que expresó megalina.

EJEMPLO 3. Desarrollo de estudios comportamentales de los ratones EMD

Las pruebas conductuales se realizaron a los 6 meses de edad. Después de la adaptación a la manipulación humana, se realizaron pruebas de comportamientos durante 11 días. La alternancia espontánea, testada con el test laberinto en T, fue evaluada durante 10 días, coincidiendo desde el primer día (días 1 al 3) con el test del campo abierto. La evaluación fue completada por la prueba de reconocimiento de objetos (días 10 y 11). En el laberinto en T, se registraron el número de alteraciones y errores (entradas de los brazos visitados anteriormente) y el tiempo para completar cada sesión. El campo abierto fue hecho en un laberinto con una superficie de 50 cm x 50 cm, paredes de 38 cm de alto y una zona central con una superficie de 25 cm x 25 cm. Los ratones fueron colocados en una esquina del campo abierto y evaluados en sesiones de 5 min por 3 días. En el campo abierto se determinó las entradas y el tiempo transcurrido en la zona central como medidas de un comportamiento relacionadas con la ansiedad. El índice de reconocimiento, definido como el cociente entre el tiempo pasado explorando el objeto nuevo y el tiempo de exploración de ambos objetos, se utiliza para medir la memoria.

En el estudio se utilizaron un total de 62 ratones macho (27 EMD y 35 controles). Por otra parte, se estudió el comportamiento de dos líneas de ratones transgénicos modelos de amiloidosis, los ratones transgénicos que sobre expresan el péptido humano APP695, y los ratones doble transgénicos APP/Ps1, un cruce entre ratones que sobreexpresan el péptido humano APP695 y la forma mutante Ps1 (M146L).

Se evaluó el comportamiento de los ratones EMD y controles de 6 meses de edad. En el test laberinto en T, se encontró un incremento significativo en la latencia respecto a los ratones controles que fue similar a la que exhiben los modelos de amiloidosis, los ratones APP/PS1 y los ratones APP (Figura 2A). Respecto al test del campo abierto, de nuevo los ratones EMD se comportan de forma similar a los modelos de amiloidosis. El tiempo que permanece en la zona central del laberinto es significativamente menor, tanto en el primer día como en el 2º y 3º, en comparación con los ratones controles. En cuanto a las veces que entra en la zona central, la tendencia es similar siendo más acentuada en primer día del ensayo (Figura 2B). Estos resultados indican déficits conductuales en los ratones EMD similares a los observados en los modelos murinos de amiloidosis.

Finalmente la capacidad cognitiva fue estudiada mediante el test de memoria visual, sometiendo a los animales al test del reconocimiento de objetos. Los ratones EMD de 6 meses de edad pasan menos tiempo inspeccionando el objeto nuevo comparado con el tiempo que emplean los ratones controles (Figura 2C). Esta reducción en el tiempo que pasan con el objeto nuevo es similar al observado en los ratones APP/Ps1 y en los ratones APP (Figura 2C).
5 Estos resultados indican que la memoria de trabajo está alterada en los ratones EMD de forma similar a lo sucedido en los modelos murinos de amiloidosis.

Resumiendo, los estudios de comportamiento realizados a los ratones EMD a los 6 meses de edad reflejan un grado mayor de ansiedad. Por otra parte, estos animales también exhiben una significativa reducción en la capacidad de aprendizaje y la memoria espacial a corto plazo, la más afectada en la enfermedad de Alzheimer. Estos resultados
10 están de acuerdo con un estudio in vivo reciente desarrollado sobre el efecto de la eliminación de la proteína LRP-1 a nivel de la microvasculatura cerebral y la alteración en la memoria (Jaeger et al, 2009). En este estudio describen que la eliminación selectiva de la expresión de la proteína LRP-1 a nivel de la BBB reduce la capacidad de aprendizaje y memoria utilizando los mismos test de comportamiento (el laberinto en T y el reconocimiento de objetos).

15 Con estos ejemplos se muestra que el modelo de ratón EMD desarrolla de forma natural y a una edad temprana (6 meses de edad) un fenotipo de comportamiento ansiolítico y de déficit de memoria semejante al que desarrollan otros modelos murinos de amiloidosis como son los ratones APP/Ps1 y los ratones APP.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Modelo animal no humano caracterizado por la ausencia de megalina producida mediante la delección del gen *LRP-2* localizada específicamente en el endotelio de los capilares cerebrales.
- 2.- Modelo animal según la reivindicación 1 donde el animal no humano es un roedor o un primate.
- 3.- Modelo animal según la reivindicación 2 donde el roedor es un ratón o una rata.
- 10 4.- Modelo animal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el animal es un animal transgénico.
- 5.- Procedimiento para la obtención de un modelo animal no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende la eliminación de megalina específicamente en el endotelio de los capilares cerebrales mediante la delección del gen *LRP-2*.
- 15 6.- Procedimiento según la reivindicación 5 donde la delección del gen *LRP-2* se produce mediante transgénesis.
- 7.- Procedimiento según la reivindicación 6 donde la delección mediante transgénesis se realiza mediante el sistema Cre/lox.
- 20 8.- Uso de un modelo animal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el estudio de una enfermedad neurodegenerativa.
- 25 9.- Uso de un modelo animal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la identificación y/o evaluación de compuestos o composiciones para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.
- 10.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9 donde la enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad neurodegenerativa humana.
- 30 11.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 donde la enfermedad neurodegenerativa es la Enfermedad de Alzheimer.

FIG. 1

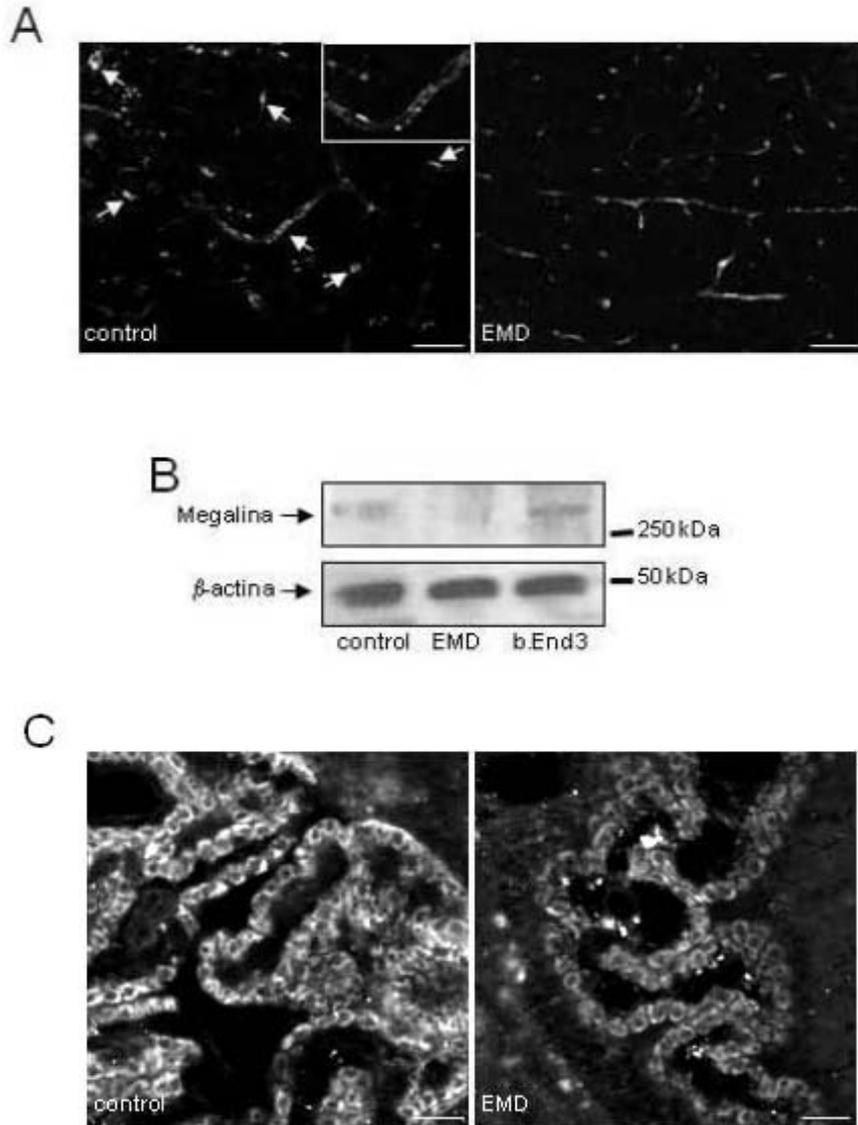


FIG. 2

