



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00377**

(22) Data de depozit: **30/06/2021**

(41) Data publicării cererii:
29/11/2021 BOPI nr. **11/2021**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ"**,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **CUCOȘ CĂTĂLINA ANCA**,
STR.MARIA CUNȚAN, NR.1, BL.S40, SC.3,
AP.101, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• **MILANESI ELENA, ȘOS.FUNDENI**,
NR.250C, AP.17, SC.B, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;

• **DOBRE MARIA**,
STR.DOCTOR NICULAE D.STAICOVICI,
NR.53, SC.A, AP.1, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **ANGHELACHE ILIUȚĂ LAURENȚIU**,
STR.DRAGOȘ VODĂ, NR.17,
SLĂNIC PRAHOVA, PH, RO;
• **CUADRADO ANTONIO PASTOR**,
AVE.CONDESA DE CHINCON 19, P12,
BOADILLA DEL MONTE, MADRID, ES;
• **MANDA GINA**, STR.DR.EUGEN O.IOSIF
NR.9, AP.1, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **METODĂ DE EVALUARE A DEZINHIBIȚIEI
COMPORTAMENTALE ÎNTR-UN MODEL ANIMAL DE BOALĂ
ALZHEIMER (ȘOARECI TRANSGENICI APP/TAU),
UTILIZÂND LABIRINTUL RADIAL CU OPT BRAȚE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de evaluare a modificărilor comportamentale într-un model animal de Boală Alzheimer (BA) în vederea testării preclinice a medicamentelor destinate BA. Metoda, conform invenției, constă în cuantificarea timpului petrecut de șoarecii transgenici APP/TAU (AT) în explorarea labirintului radial cu opt brațe, a timpului de inactivitate în interiorul labirintului, cât și a numărului de recompense alimentare consumate, în fazele de: (1) habituale, (2) învățare

cu evaluare și (3) evaluare și înregistrare separată a datelor experimentale obținute pentru lotul de șoareci AT față de lotul de șoareci control, furnizând informații despre dezinhibiția comportamentală a șoarecilor cu BA.

Revendicări: 3
Figuri: 4



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2021 377
Data depozit 30-06-2021

RO 135289 A0

54

12.2 DESCRIEREA INVENȚIEI

METODĂ DE EVALUARE A DEZINHIBIȚIEI COMPORTAMENTALE ÎNTR-UN MODEL ANIMAL DE BOALĂ ALZHEIMER (ȘOARECI TRANSGENICI APP/TAU), UTILIZÂND LABIRINTUL RADIAL CU OPT BRAȚE

INTRODUCERE

Prezenta invenție se referă la o metodă nouă de evaluare a dezinhibiției comportamentale la șoareci APP/TAU care dezvoltă Boală Alzheimer (BA), utilizând labirintul radial cu opt brațe.

Invenția răspunde nevoii actuale de dezvoltare a unor noi metode de evaluare a modificărilor comportamentale la animale mici de laborator în vederea testării preclinice a medicamentelor destinate BA.

JUSTIFICARE

Potrivit Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), BA este cea mai întâlnită formă de demență, fiind caracterizată ca o tulburare neurodegenerativă severă, progresivă, asociată cu pierderea memoriei și afectarea cognitivă, însoțită de comportament anormal și modificări ale personalității [Revi M. Alzheimer's Disease Therapeutic Approaches. Adv Exp Med Biol. 2020;1195:105–16]. Se estimează că numărul persoanelor cu demență la nivel mondial va crește la 131,5 milioane până în 2050, în principal datorită creșterii speranței de viață [Sengoku R. Aging and Alzheimer's disease pathology. Neuropathology. 2020 Feb;40(1):22–9]. Deși în ultimele decenii s-au descoperit terapii care ameliorează simptomatologia BA, în prezent nu există niciun tratament care să vindece sau să încetinească semnificativ progresia bolii [Loera-Valencia R, Cedazo-Mínguez A, Kenigsberg PA, Page G, Duarte AI, Giusti P, et al. Current and emerging avenues for Alzheimer's disease drug targets. J Intern Med. 2019;286(4):398–437]. În consecință, dezvoltarea unor medicamente destinate BA reprezintă o cerință stringentă, care implică și lărgirea ariei de metode pentru evaluarea preclinică a acestor medicamente, inclusiv din punctul de vedere al efectului lor asupra modificărilor comportamentale specifice BA.

Este cunoscut faptul că pacienții diagnosticați cu Boala Alzheimer (BA) prezintă modificări comportamentale și psihologice severe, printre care se înscrie și dezinhibirea comportamentală, agitația și tulburările alimentare [Keszycki RM, Fisher DW, Dong H. The Hyperactivity-Impulsivity-Irritability-Disinhibition-Aggression-Agitation Domain in

Alzheimer's Disease: Current Management and Future Directions. *Front Pharmacol.* 2019;10:1109; Kales HC, Lyketsos CG, Miller EM, Ballard C. Management of behavioral and psychological symptoms in people with Alzheimer's disease: an international Delphi consensus. *Int psychogeriatrics.* 2019;31(1):83–90]. Aceste modificări comportamentale sunt replicate, cel puțin parțial, la modelele animale care dezvoltă BA și care manifestă dezinhibare comportamentală, hiperactivitate și hiperfagie [Harris JA, Devidze N, Verret L, Ho K, Halabisky B, Thwin MT, et al. Transsynaptic progression of amyloid- β -induced neuronal dysfunction within the entorhinal-hippocampal network. *Neuron.* 2010 Nov 4;68(3):428–41; Adebakin A, Bradley J, Gümüşgöz S, Waters EJ, Lawrence CB. Impaired satiation and increased feeding behaviour in the triple-transgenic Alzheimer's disease mouse model. *PLoS One.* 2012;7(10):e45179; Lippi SLP, Smith ML, Flinn JM. A Novel hAPP/htau Mouse Model of Alzheimer's Disease: Inclusion of APP With Tau Exacerbates Behavioral Deficits and Zinc Administration Heightens Tangle Pathology. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:382]. Astfel, șoarecii care au modificări comportamentale similare pacienților cu BA reprezintă modele animale adecvate pentru evaluarea preclinică a efectelor unor medicamente destinate uzului uman în BA [Puzzo D, Gulisano W, Palmeri A, Arancio O. Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2015 Jul;10(7):703–11].

DESCRIERE

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este stabilirea unei metode de evaluare a dezinhibiției comportamentale la un model animal de BA reprezentat de șoareci transgenici APP/TAU [Rojo AI, Pajares M, Rada P, Nuñez A, Nevado-Holgado AJ, Killik R, et al. NRF2 deficiency replicates transcriptomic changes in Alzheimer's patients and worsens APP and TAU pathology. *Redox Biol.* 2017;13:444–51], utilizând labirintul radial cu opt brațe bazat pe recompense alimentare, căruia i se dă astfel o nouă utilizare.

Metoda se bazează pe motivarea animalelor experimentale de a căuta recompensele alimentare, după ce în prealabil au fost deprivate de hrană. Metoda constă în cuantificarea timpului petrecut de șoarecii APP/TAU în explorarea labirintului, a timpului de inactivitate în interiorul labirintului, cât și a numărului de recompense alimentare mâncate în timpul experimentului. Această metodă aduce informații privind dezinhibarea comportamentală și aportul alimentar crescut la șoarecii care mimează BA umană comparativ cu șoareci normali.

Invenția reprezintă o variantă modificată a metodei „Win-Stay” care utilizează labirintul radial cu opt brațe bazat pe recompense alimentare și care se bazează pe motivarea animalelor mici de laborator (șoareci) de a căuta recompensele alimentare după ce în prealabil au fost deprivat de hrană. Metoda „Win-Stay” este utilizată pentru evaluarea cogniției, respectiv a memoriei spațio-temporale și a memoriei de lucru la animalele mici de laborator (DeLuca, S.N., L. Sominsky, and S.J. Spencer, Delayed Spatial Win-Shift Test on Radial Arm Maze. Bio-Protocol, 2016. 6(23); p. e2053 și UCLA Behavioral Testing Core. Radial Arms Maze. No Date [cited 2017; Available from: <https://btc.psych.ucla.edu/behavioral-testing-core-facilitys-available-tasks/mouse-and-rat-services/radial-arms-maze/>]. Invenția fundamentează o nouă aplicație a labirintului radial cu opt brațe bazat pe recompense alimentare, respectiv evaluarea dezinhibiției comportamentale în model animal de șoareci cu BA.

Comparativ cu metoda „Win-Stay” care are două faze experimentale (habituație și învățare cu evaluare), invenția propusă are trei faze experimentale, respectiv (1) faza de habituație, (2) faza de învățare cu evaluare și (3) faza de evaluare a animalelor experimentale în labirintul radial cu opt brațe. Modificările aduse de prezenta invenție la metoda „Win-Stay”, ca și parametrii măsurați prin fiecare metodă sunt prezentați în Tabelul 1, evidențiindu-se diferențele procedurale și de aplicație dintre cele două metode.

Tabel 1. Descrierea metodei propuse pentru evaluarea a dezinhibiției comportamentale, comparativ cu metoda „Win-Stay” pentru evaluarea cogniției animalelor mici de laborator. Modificările aduse sunt marcate prin sublinierea acestora și sunt justificate.

Metoda „Win-Stay”	Metoda de evaluare a dezinhibiției comportamentale	Justificarea modificărilor aduse
SCOP		
Evaluarea procesului de învățare (proces cognitiv) a animalelor experimentale prin cuantificarea greșelilor (intrări în brațe fără recompense, reintrări în brațe și ignorarea recompenselor)	Evaluarea <u>dezinhibiției comportamentale</u> prin cuantificarea timpului de explorare a brațelor, a timpului de staționare în bază (inactivitate) și a recompenselor consumate.	O nouă utilizare a labirintului radial cu opt brațe bazat pe recompense alimentare, respectiv pentru evaluarea dezinhibiției comportamentale.
1. FAZA de HABITUARE		
2 sesiuni de habituaire de 10 minute/zi , timp de 2 zile	1 sesiune de habituaire de <u>5 minute/zi</u> , timp de <u>5 zile</u>	Conform propunerii de brevet, familiarizarea șoarecilor cu labirintul, camera de lucru și experimentatorul trebuie să se realizeze pe parcursul a mai multor zile (5 zile), spre deosebire de doar 2 zile propuse de autorii procedurii „Win-Stay”. Această modificare a fost necesară pentru a le lăsa șoarecilor timp pentru acomodare cu schimbările aduse. Șoarecii de laborator se tem de manipularea de către experimentator, necesitând un timp mai lung de acomodare cu manipularea, ca și cu experimentatorul. Experiența prealabilă de manipulare poate avea efecte pozitive sau negative asupra răspunsului animalelor la factorii de stres, care influențează experimentele, în funcție de experiența animalului în timpul manipulării [Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. Nat Methods. 2010 Oct;7(10):825–6]. De aceea este foarte importantă fază de habituaire și trebuie să i se acorde o atenție specială și un timp mai îndelungat.
2. FAZA de ÎNVĂȚARE cu EVALUARE		
a. Sesiunea de învățare (5 minute) - Se aleg 4 brațe (pot fi consecutive două câte două) în care se vor pune recompense alimentare;	a. Sesiunea de învățare (5 minute) - Se aleg 3 brațe (neconsecutive) în care se vor pune recompense alimentare;	Cele trei brațe cu recompensă au fost alese în așa fel încât să nu existe două brațe consecutive cu recompensă, pentru a evita apariția stereotipurilor comportamentale, și anume de a intra din braț în

<ul style="list-style-type: none"> - Se vor deschide doar uşile braţelor ce conţin recompensele; celelalte braţe rămân cu uşile închise; - Şoarecele este introdus în labirint şi este lăsat 5 minute sa exploreze. După acest timp şoarecele este pus înapoi în cuşcă timp de 5 minute, timp în care se curăţă labirintul. b. Sesiunea de evaluare (5 minute) <ul style="list-style-type: none"> - După ce au trecut cele 5 minute, şoarecele este introdus din nou în labirint. Recompensele alimentare se păstrează în aceeaşi poziţie. Se deschid toate uşile şi animalul este liber să exploreze toate braţele. <p>Această fază se repetă de 2 ori/zi, până când media greşelilor per sesiune în grupul control are valoarea ≤ 1.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Se vor deschide doar uşile braţelor ce conţin recompensele; celelalte braţe rămân cu uşile închise; - Şoarecele este introdus în labirint şi este lăsat 5 minute sa exploreze. După acest timp şoarecele este pus înapoi în cuşcă timp de 5 minute, timp în care se curăţă labirintul. b. Sesiunea de evaluare (5 minute) <ul style="list-style-type: none"> - După ce au trecut cele 5 minute, şoarecele este introdus din nou în labirint. Recompensele alimentare se păstrează în aceeaşi poziţie. Se deschid toate uşile şi animalul este liber să exploreze toate braţele. <p>Această fază se repetă o dată/zi, timp de 5 zile.</p>	<p>braţ în căutarea recompenselor. Recompensele alimentare utilizate de noi au fost reprezentate de seminţe crude de floarea soarelui (1/3 miez sămânţă/brat) care reprezintă o atracţie pentru şoareci.</p> <p>Faza de învăţare cu evaluare, compusă din 2 sesiuni de 5 minute/animal, este efectuată o singură dată pe zi, şi nu de două ori, așa cum este propus în procedura „Win-Stay”, pentru a evita stresarea animalelor, şi pentru a reduce perioada de suspendare a hranei.</p>
<p>3. FAZA de EVALUARE</p>		
<p>Nu este descrisă</p>	<p>O sesiune de evaluare de 5 minute /zi; Se păstrează aceleaşi braţe cu recompense alimentare, din faza de învăţare. Şoarecele este introdus în labirint şi este liber să exploreze toate braţele, timp de 5 minute. Sesiunea este oprită mai devreme dacă toate recompensele au fost mâncate (sarcina a fost îndeplinită). O durată mai scurtă a sesiunii repezintă un grad mai mare de dezinhibiţie.</p>	<p>Am introdus suplimentar faza de evaluare, faţă de fazele descrise în procedura „Win-Stay”, atât pentru a urmări modificările comportamentale la animalele experimentale, cât şi pentru a reduce numărul de sesiuni de examinare/şoarece/zi, cu scopul de a evita stresarea animalelor.</p>
<p>Recompensele utilizate</p>		
<p>Hrană standardizată</p>	<p>Seminţe crude de floarea soarelui</p>	<p>Pentru a trezi curiozitatea şoarecilor (hrană pe care o agreează şi nu o consumă frecvent), cât şi pentru a-i motiva.</p>
<p>PARAMETRI ANALIZATI</p>		
<p>Se înregistrează numărul de alegeri corecte şi incorecte pe care le face subiectul în colectarea recompenselor.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Valoarea procentuală a timpului petrecut de şoareci în zonele labirintului; - Valoarea procentuală a timpului de inactivitate petrecut de şoareci în zonele labirintului; - Numărul de recompense consumate; - Timpul mediu de completare a labirintului (secunde). 	<p>În metoda propusă au fost utilizaţi parametri numerici obiectivi, prin care se poate caracteriza starea de dezinhibiţie comportamentală la şoareci.</p>

Animale. În studiul demonstrativ au fost incluși șase șoareci transgenici APP/TAU (AT) furnizați de CIBERNED (Spania), două femele și patru masculi, cu vârsta medie de 56.00 ± 0.63 săptămâni (55-57 săptămâni). Modelul transgenic APP/TAU a fost obținut prin încrucișarea pentru mai mult de opt generații a șoarecilor care prezintă mutația **APP-V717I** (izoforma umană hAPP695), cu șoareci transgenici **TAUP301L** care exprimă cea mai lungă izoformă umană a proteinei TAU. Ambele tipuri de șoareci au fondul genetic C57/BL6j [Rojo AI, Pajares M, Rada P, Nuñez A, Nevado-Holgado AJ, Killik R, et al. NRF2 deficiency replicates transcriptomic changes in Alzheimer's patients and worsens APP and TAU pathology. *Redox Biol.* 2017;13:444–51]. Șoarecii transgenici AT mimează patologia BA în regiunile cerebrale relevante (hipocampus, neocortexul, cortexul entorhinal, cortexul piriform și amigdala). Acumularea de amiloid începe la vârste fragede, intracelular, scade odată cu îmbătrânirea și este înlocuită progresiv cu depuneri de amiloid extracelular, mai întâi sub formă de plăci difuze (10-12 luni), urmate de plăci senile (12-15 luni) și depozite de amiloid la nivel vascular (15-18 luni). Tauopatia (formarea de fibrile de proteină Tau), în special la nivelul creierului anterior și hipocampusului, apare în jurul vârstei de 13 luni. Astfel, șoarecii AT utilizați în acest studiu reprezintă un model experimental care mimează BA odată cu îmbătrânirea animalelor, prin inducerea unei patologii combinate amiloid și Tau, observată în creierul pacienților cu BA, caracterizată prin plăci de amiloid difuze și senile, amiloid vascular și fibrile Tau [Terwel D, Muyliaert D, Dewachter I, Borghgraef P, Croes S, Devijver H, et al. Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. *Am J Pathol* 2008 Mar;172(3):786–98]. Grupul control a fost constituit din 6 șoareci control C57/BL6j (WT), masculi cu vârsta medie de 59.00 ± 0.51 săptămâni (59-60 săptămâni).

Toate experimentele pe animale au fost aprobate de comitetul local de etică și de Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor, Direcția Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor București (numărul de înregistrare 385 din 9.02.2018), în conformitate cu Directiva europeană 2010/63 / UE.

Mentținerea coloniilor de șoareci. Șoarecii au fost adăpostiți în cuști simple în condiții standardizate: ciclu lumină/întuneric de 12 ore, temperatura și umiditatea controlată ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 10\%$). Șoarecii au avut acces *ad libitum* la apă și hrană standardizată.

Pregătirea șoarecilor pentru experiment. Cu 4 ore înainte de începerea experimentului s-a ridicat hrana animalelor experimentale (deprivarea temporară a animalelor de hrană). Greutatea

animalelor a fost monitorizată săptămânal pe toată perioada experimentului, animalele experimentale netrebuind să piardă mai mult de 20% din greutatea inițială.

Testarea șoarecilor în labirintul radial cu opt brațe. Habituarea, învățarea și evaluarea animalelor experimentale s-a realizat conform procedurii descrise în Tabelul 1. A fost utilizat dispozitivul reprezentat în Figura 1, care are ca element central de experimentare labirintul radial automat cu opt brațe pentru șoareci (Panlab, Harvard Apparatus, Spania). Labirintul a fost amplasat la o distanță de aproximativ un metru de sol, înconjurat de panouri protectoare. Pe aceste panouri au fost montate trei indicatoare externe diferite, reprezentând de figuri geometrice (cerc, pătrat și triunghi), iar în interiorul labirintului au fost amplasate aceleași indicatoare, păstrând disponerea exterioară, cu scopul de a marca brațele cu recompense alimentare. Scopul indicatoarelor a fost acela de a ajuta animalele experimentale în găsirea recompenselor alimentare prin crearea unei hărții vizuale a mediului. Manipularea șoarecilor și efectuarea experimentului au fost efectuate de un singur experimentator pentru a minimiza stresul animalelor. Este cunoscut faptul că manipularea animalelor experimentale poate afecta rezultatele testelor comportamentale, șoarecii manipulați de experimentator în mod repetat înainte de efectuarea testelor comportamentale finale prezentând un grad redus de anxietate [Ueno H, Takahashi Y, Suemitsu S, Murakami S, Kitamura N, Wani K, et al. Effects of repetitive gentle handling of male C57BL/6NCrl mice on comparative behavioural test results. Sci Rep. 2020;10(1):3509].

Monitorizarea animalelor pe parcursul experimentului. Activitatea șoarecilor pe parcursul experimentului a fost vizualizată cu ajutorul unei camere video amplasată deasupra labirintului, iar datele experimentale (Tabelul 1) au fost înregistrate cu programele MAZESOFT-8 și SMART Video Tracking System (Panlab, Harvard Apparatus, Spania), conform manualului de instrucțiuni (<https://www.panlab.com/en/products/mazesoft8-software-panlab>, <https://panlab.app.box.com/s/7wp6l4i449rzec1gzydw>). Înregistrarea datelor s-a efectuat individual, pentru fiecare șoarece în parte, în cele 3 zone ale labirintului (bază, brațe cu recompense și brațe fără recompense). Timpul maxim alocat unei sesiuni de evaluare a fost de 5 minute. În cazul în care toate cele trei recompense alimentare au fost consumate într-un timp mai scurt de 5 minute, sesiunea s-a considerat finalizată. Valorile timpului petrecut de șoareci în zonele labirintului mai sus menționate, cât și valorile timpului de inactivitate au fost exprimate procentual, considerând faptul că au fost sesiuni de evaluare finalizate într-un timp mai scurt de 5 minute.

Colectarea și procesarea datelor. Datele analizate au fost: (a) valoarea procentuală a timpului petrecut de șoareci în zonele labirintului, (b) valoarea procentuală a timpului de inactivitate petrecut de șoareci în zonele labirintului (c) numărul de recompense consumate și (d) timpul mediu de completare a labirintului (secunde).

Valorile procentuale ale timpului petrecut de șoareci în zonele labirintului și valorile procentuale ale timpului de inactivitate în interiorul labirintului au fost obținute de programul SMART Video Tracking System (Panlab, Harvard Apparatus, Spania). Programul se bazează pe un sistem de urmărire video care procesează secvența de imagini (cadre) care provin dintr-o sursă și extrage informațiile legate de comportamentul animalului (timp, viteză, etc.). Camera video furnizează computerului secvența de imagini în același timp în care animalul se deplasează în labirint, având o precizie de 16 de cadre pe secundă (fps). Fiecare cadru este generat prin conversia culorii scenei reale într-o matrice de valori digitale (pixeli). Programul analizează apoi fiecare pixel al fiecărui cadru pentru a furniza informații privind traseul șoarecilor în timpul sesiunilor de examinare și date numerice privind valorile procentuale ale timpului petrecut de șoarece în zonele labirintului și valorile procentuale ale timpului de inactivitate în interiorul labirintului.

Numărul de recompense consumate pe sesiune a fost evaluat la finalul fiecărei sesiuni prin numărarea acestora. Timpul mediu de completare a labirintului a fost evaluat cu programul MAZESOFT-8 (Panlab, Harvard Apparatus, Spania).

Datele numerice au fost analizate statistic cu programul GraphPad Prism 9 și au fost prezentate ca valoare medie \pm deviație standard. Comparația între loturile de animale s-a realizat prin testul t-Student.

REZULTATELE OBȚINUTE

Datele experimentale obținute sunt prezentate în Tabelele 2 și 3. Rezultatele au fost înregistrate separat pentru cele două loturi luate în studiu (lotul de șoareci AT și lotul de șoareci control WT) și au fost exprimate ca valoare medie \pm deviație standard pentru fiecare parametru analizat, în faza de învățare cu evaluare (5 sesiuni) sau în faza de evaluare (8 sesiuni).

Timpul petrecut de șoareci în zonele labirintului

Datele privind valoarea procentuală a timpului petrecut de șoareci în zonele labirintului au arătat că șoarecii AT comparativ cu șoarecii control WT au petrecut mai mult timp explorând brațele cu recompense, și mai puțin timp în bază, atât în perioada de învățare, cât și în perioada de evaluare, demonstrând faptul că șoarecii AT au fost mai curioși și nu au prezentat teamă în

cercetarea brațelor labirintului. În patru sesiuni de învățare cu evaluare, din cele 5 sesiuni realizate, diferențele dintre cele două loturi au fost semnificative (valoarea $p < 0.05$), în sesiunea doi păstrându-se tendința de creștere a valorii procentuale a timpului petrecut de șoareci în zonele labirintului în lotul șoarecilor transgenici AT comparativ cu șoarecii control WT. În toate cele opt sesiuni ale perioadei de evaluare diferențele dintre cele două loturi au fost statistic semnificative ($p < 0.05$), șoarecii AT petrecând mai mult timp pentru a explora brațele cu recompense, comparativ cu șoarecii control WT. Șoarecii control WT au prezentat teamă în explorarea labirintului, petrecând semnificativ mai mult timp în bază, comparativ cu șoarecii AT, atât în perioada de învățare (în toate cele 5 sesiuni), cât și în perioada de evaluare (în 5 din cele 8 sesiuni). În sesiunile în care diferențele nu au fost semnificative din punct de vedere statistic, s-a observat tendința crescătoare în cazul lotului de șoareci control WT. Privitor la rezultatele obținute în brațele fără recompense, diferențele între cele două loturi de șoareci nu au fost semnificative (Tabelul 2). Valorile medii procentuale ale timpului petrecut de șoareci în zonele labirintului \pm deviația standard (bază și brațe cu recompensă) sunt reprezentate grafic în Figura 2.

Timpul de inactivitate petrecut de șoareci în zonele labirintului

Faptul că șoarecii transgenici AT prezintă dezinhibiție comportamentală exprimată prin curiozitatea de a explora brațele labirintului este demonstrată și prin analiza statistica a valorilor procentuale privind timpul de inactivitate petrecut de șoareci în zonele labirintului. Astfel, șoarecii AT au avut un timp mai mic de inactivitate în baza labirintului, comparativ cu șoarecii control WT, pentru aceștia din urmă înregistrându-se un timp de inactivitate semnificativ mai mare în baza labirintului, atât în perioada de învățare (în toate cele 5 sesiuni), cât și în perioada de evaluare (în 5 din cele 8 sesiuni). În sesiunile în care diferențele nu au fost semnificative din punct de vedere statistic, șoarecii control WT au prezentat o tendință de creștere a timpului de inactivitate petrecut în bază (Tabelul 2). Șoarecii transgenici AT, comparativ cu șoarecii control WT, au avut un timp semnificativ mai mare de inactivitate în brațele cu recompense, deoarece aceștia au consumat recompensele alimentare. Din cele 5 sesiuni de învățare cu evaluare, în patru sesiuni diferențele dintre cele două loturi au fost semnificative ($p < 0.05$), în sesiunea doi tendință păstrându-se totuși crescătoare în lotul șoarecilor transgenici AT comparativ cu șoarecii control WT. În toate cele opt sesiuni ale perioadei de evaluare diferențele dintre cele două loturi au fost semnificative ($p < 0.005$), în cazul șoarecilor AT înregistrându-se un timp semnificativ mai mare de inactivitate în brațele cu recompense, datorită consumării recompenselor alimentare. În ceea ce privește rezultatele obținute

în brațele fără recompense, diferențele între cele două loturi de șoareci nu au fost semnificative (Tabelul 2).

Tabelul 2. Rezultatele obținute în faza de învățare cu evaluare. Rezultatele sunt exprimate ca valoare medie \pm deviație standard. Compararea între lotul de șoareci AT și lotul de șoareci control WT s-a realizat prin testul t-Student. Diferențele între loturi s-au considerat semnificative dacă valoarea $p < 0.05$.

A. Faza de învățare cu evaluare (5 zile)

Zona labirint	Ziua	Valoarea procentuală a timpului petrecut de șoareci în zonele labirintului					Valoarea procentuală a timpului de inactivitate petrecut de șoareci în zonele labirintului				
		AT (N=6)		WT (N=6)		Valoarea P	AT (N=6)		WT (N=6)		Valoarea P
		Media	Deviația standard	Media	Deviația standard		Media	Deviația standard	Media	Deviația standard	
Bază	1	24.22	7.25	43.08	15.49	0.022	20.00	7.71	37.84	13.88	0.020
	2	19.21	17.03	40.59	12.34	0.032	15.35	15.28	35.29	11.55	0.029
	3	12.87	10.35	50.06	10.61	0.000	9.87	8.92	44.85	11.40	0.000
	4	22.24	12.37	57.26	10.43	0.000	18.32	11.50	52.5	11.92	0.000
	5	19.29	6.94	44.07	13.65	0.003	15.16	5.99	39.19	14.01	0.003
Brațe cu recompensă	1	40.69	8.90	21.90	14.71	0.023	34.66	7.96	17.96	13.34	0.025
	2	37.17	26.78	19.99	10.3	0.173	31.70	23.67	16.87	10.55	0.191
	3	46.91	30.79	12.47	6.23	0.023	41.31	27.96	8.65	3.70	0.018
	4	46.09	7.63	17.70	7.43	0.000	39.44	6.94	12.81	5.73	0.000
	5	55.79	14.27	23.18	8.94	0.001	46.90	14.43	18	7.96	0.002
Brațe fără recompensă	1	34.65	5.78	34.68	13.54	0.996	24.21	4.73	26.48	13.53	0.706
	2	43.46	30.02	39.22	10.77	0.751	35.29	31.35	27.26	8.65	0.559
	3	39.77	32.59	36.72	11.15	0.833	34.28	32.77	27.4	11.21	0.637
	4	31.05	9.50	24.9	5.09	0.192	20.90	7.86	16.43	3.24	0.227
	5	24.44	9.55	32.52	7.45	0.133	15.23	6.99	21.75	4.62	0.086

B. Faza de evaluare (8 zile)

Zona labirint	Ziua	Valoarea procentuală a timpului petrecut de șoareci în zonele labirintului					Valoarea procentuală a timpului de inactivitate petrecut de șoareci în zonele labirintului				
		AT (N=6)		WT (N=6)		Valoarea p	AT (N=6)		WT (N=6)		Valoarea p
		Media	Deviația standard	Media	Deviația standard		Media	Deviația standard	Media	Deviația standard	
Bază	1	31.51	14.13	62.77	15.7	0.005	28	13.63	58.7	17.19	0.006
	2	23.94	7.11	45.4	13.77	0.007	19.86	5.64	38.04	15.09	0.020
	3	26.74	14.81	55.47	17.62	0.012	22.88	15.87	49.91	19.43	0.025
	4	22.21	9.42	28.66	12.07	0.326	18.08	9.64	21.5	11.85	0.595
	5	25.23	11.62	44.76	10.78	0.013	21.65	10.09	37.66	11.22	0.027
	6	22.35	8	48.41	17.74	0.008	18.01	6.33	42.53	20.2	0.018
	7	26.33*	8.52	41.91*	14.64	0.103	22.09*	9.78	32.93*	16.16	0.280
	8	23.78	8.52	35.07	9.54	0.056	18.64	10.09	26.04	10.62	0.244
Brațe cu recompensă	1	47.87	14.74	13.17	9.83	0.001	41.53	14.68	9.05	7.17	0.001
	2	54.16	12.47	23.38	9.84	0.001	47.14	14.34	16.57	8.19	0.001
	3	45.76	18	17.16	7.72	0.005	38.38	15.29	11.5	5.85	0.002
	4	47.46	7.7	21.47	11.1	0.001	39.47	6.66	15.47	7.78	0.000
	5	46.64	17.21	17.22	5.13	0.002	40.24	15.95	11.37	4.4	0.002
	6	53.46	16.56	17.53	9.68	0.001	45.95	16.32	11.65	6.58	0.001
	7	49.72*	14.04	20.49*	5.58	0.004	39.8*	12.8	11.9*	3.77	0.002
	8	50.6	10.95	28	7.53	0.002	42.86	12.53	18.29	4.71	0.001
Brațe fără recompensă	1	20.16	6.83	23.77	8.04	0.421	12.03	3.83	16.09	6.43	0.213
	2	21.67	10.45	31.16	8.57	0.116	12.82	6.99	18.8	5.15	0.122
	3	27.32	6.51	27.14	10.69	0.973	16.68	7.08	17.33	7.4	0.880
	4	29.45	9.02	49.77	18.11	0.034	19.18	7.64	35.6	21.62	0.110
	5	27.6	18.06	37.69	6.69	0.228	19.72	19.01	24.37	6.09	0.581
	6	23.53	9.47	33.59	12.1	0.140	13.92	8.34	21.19	8.53	0.166
	7	22.63*	11.12	37.3*	11.26	0.092	13.24*	8.65	21.64*	7.46	0.161
	8	25.18	10.77	36.6	8.16	0.065	14.18	6.32	20.77	6.21	0.098

*În ziua 7 de evaluare analiza statistică s-a efectuat pe 4 șoareci AT și 5 WT, deoarece a apărut o eroare a softului SMART.

Numărul de recompense mâncate

Șoarecii transgenici AT au mâncat mai multe recompense comparativ cu șoarecii WT, atât în faza de învățare cu evaluare, cât și în faza de evaluare (Tabelul 3). Din cele 5 sesiuni de învățare cu evaluare, în 3 sesiuni diferențele dintre cele două loturi au fost semnificative ($p < 0.05$), în celelalte două sesiuni păstrându-se tendința de creștere în lotul șoarecilor transgenici AT comparativ cu șoarecii control WT. În toate cele opt sesiuni ale perioadei de evaluare diferențele dintre cele două loturi au fost statistic semnificative ($p < 0.05$). Rezultatele obținute sunt reprezentate grafic în Figura 3.

Tabelul 3. Media numărului de recompense consumate și timpul mediu de completare a labirintului (secunde) în faza de învățare cu evaluare (A) și în faza de evaluare (B). Compararea între lotul de șoareci AT și lotul de șoareci control WT s-a realizat prin testul t-Student. Diferențele între loturi s-au considerat semnificative dacă valoarea $p < 0.05$.

A. Faza de învățare cu evaluare (5 zile)

Ziua	1. Media număr recompense consumate				Valoarea p	2. Timpul mediu de completare a labirintului (secunde)				Valoarea p
	AT (N=6)		WT (N=6)			AT (N=6)		WT (N=6)		
	Media	Deviația standard	Media	Deviația standard		Media	Deviația standard	Media	Deviația standard	
1	2.33	1.21	0.83	0.75	0.041	300.0	0.0	300.0	0.0	1.000
2	2.00	1.26	0.50	0.84	0.065	233.0	65.2	300.0	0.0	0.065
3	2.17	1.17	0.17	0.41	0.015	233.7	78.3	300.0	0.0	0.065
4	2.83	0.41	0.17	0.41	0.002	228.8	53.6	300.0	0.0	0.015
5	1.83	1.47	0.50	0.55	0.180	198.2	113.5	300.0	0.0	0.180

B. Faza de evaluare (8 zile)

Ziua	1. Media număr recompense consumate				Valoarea p	2. Timpul mediu de completare a labirintului (secunde)				Valoarea p
	AT (N=6)		WT (N=6)			AT (N=6)		WT (N=6)		
	Media	Deviația standard	Media	Deviația standard		Media	Deviația standard	Media	Deviația standard	
1	2.17	1.33	0.00	0.00	0.015	211.2	80.0	300.0	0.0	0.065
2	2.50	1.22	0.50	0.84	0.026	218.5	71.0	290.0	24.5	0.009
3	2.50	1.22	0.17	0.41	0.015	170.7	90.9	300.0	0.0	0.015
4	2.50	0.55	0.83	0.75	0.004	223.8	85.6	300.0	0.0	0.180
5	2.83	0.41	0.00	0.00	0.002	174.3	81.6	300.0	0.0	0.015
6	2.67	0.82	0.17	0.41	0.002	190.7	88.4	300.0	0.0	0.015
7	2.17	0.98	0.17	0.41	0.004	234.7	92.0	300.0	0.0	0.180
8	2.33	1.03	0.17	0.41	0.004	196.2	86.8	300.0	0.0	0.065

Numărul de sesiuni finalizate

Faza de învățare cu evaluare a cuprins 5 sesiuni pentru fiecare șoarece (o sesiune/zi). Din totalul de 30 de evaluări pentru fiecare lot de șoareci, la șoarecii transgenici AT s-au înregistrat 16 sesiuni îndeplinite complet (toate cele trei recompense au fost consumate) într-un interval de timp mai scurt decât cel maxim posibil (5 minute). În același timp, șoarecii control WT nu și-au îndeplinit sarcina în nicio sesiune, timpul de examinare oprindu-se automat după 5 minute (Tabelul

3). Deși din cele 5 zile ale fazei de învățare cu evaluare diferențele privind timpul mediu de completare a labirintului (secunde) dintre cele două loturi au fost semnificative într-o singură zi (ziua 4), lotul șoarecilor transgenici AT a manifestat o tendință descendentă a parametrului comparativ cu lotul șoarecilor control WT, îndeplinind sarcina (consumarea celor 3 recompense) în mai puțin de 5 minute.

Faza de evaluare a fost compusă din 48 de sesiuni pentru fiecare lot de șoareci (8 zile de evaluare). Din numărul total de sesiuni, cei 6 șoarecii transgenici AT au îndeplinit sarcina în 35 de sesiuni, petrecând un timp mai scurt în labirint, comparativ cu șoarecii WT, care au îndeplinit sarcina într-o singură sesiune (Tabelul 3). Diferențele privind timpul mediu de completare a labirintului (secunde) dintre cele două loturi au fost semnificative în patru din cele 8 zile ale fazei de învățare cu evaluare, în celelate patru zile lotul șoarecilor transgenici AT au prezentat un trend descendent comparativ cu lotul șoarecilor control WT, îndeplinind sarcina (consumarea celor 3 recompense) în mai puțin de 5 minute.

Rezultatele obținute, prezentate grafic în Figurile 2 și 3, demonstrează faptul că șoarecii transgenici AT au manifestat atât dezinhibare comportamentală în explorarea labirintului, cât și hiperfagie. În același timp, șoarecii WT au manifestat teamă în explorarea labirintului, petrecând un timp mai mare în bază. Acest lucru este ilustrat demonstrativ și în harta activității unui șoarece AT comparativ cu un șoarece control WT (Figura 4). Se observă activitatea crescută a șoarecelui AT care explorează intens brațele labirintului, dovedind o dezinhibiție comportamentală în fața unui teritoriu și a unei activități noi având ca scop căutarea recompensei alimentare. În același timp, șoarecele control WT a explorat semnificativ mai puțin labirintul, petrecând un timp mai îndelungat în bază, dovedind astfel teamă și reticență în explorarea spațiului.

În concluzie, prezenta invenție definește o metodă nouă de evaluare a dezinhibiției comportamentale a animalelor APP/TAU cu BA, care utilizează labirintul radial cu opt brațe, și dă o nouă utilizare acestui dispozitiv.

LISTA de ABREVIERI

AT – APP(Proteina precursora a β -amiloidului)/TAU (proteina TAU)

APP - Proteina precursora a β -amiloidului (Amyloid Precursor Protein)

BA - Boală Alzheimer

CIBERNED - Centro de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Neurodegenerativas

OMS - Organizația Mondială a Sănătății

WT – wild type

12.3 REVENDICĂRI

1. Metodă de evaluare a dezinhibiției comportamentale în model animal de Boală Alzheimer (șoarece transgenic APP/TAU), utilizând labirintul radial cu opt brațe pe bază de recompense alimentare.
2. Metoda este o modificare a metodei „Win-Stay” prin următoarele:
 - Se utilizează trei brațe cu recompensă, astfel încât să nu existe două brațe consecutive cu recompensă, pentru a evita apariția stereotipiilor comportamentale (intra din braț în braț în căutarea recompenselor).
 - Cele 3 recompense alimentare sunt semințe crude de floarea soarelui, câte o treime în fiecare braț.
 - Faza de învățare cu evaluare durează 5 zile și se efectuează o singură dată pe zi.
 - Faza de evaluare durează 8 zile și se efectuează într-o singură sesiune pe zi de maxim 5 minute.
3. Metoda este o nouă utilizare a labirintului radial cu opt brațe bazat pe recompense alimentare, furnizând informații despre dezinhibiția comportamentală a șoarecilor cu BA.

12.4 DESENE

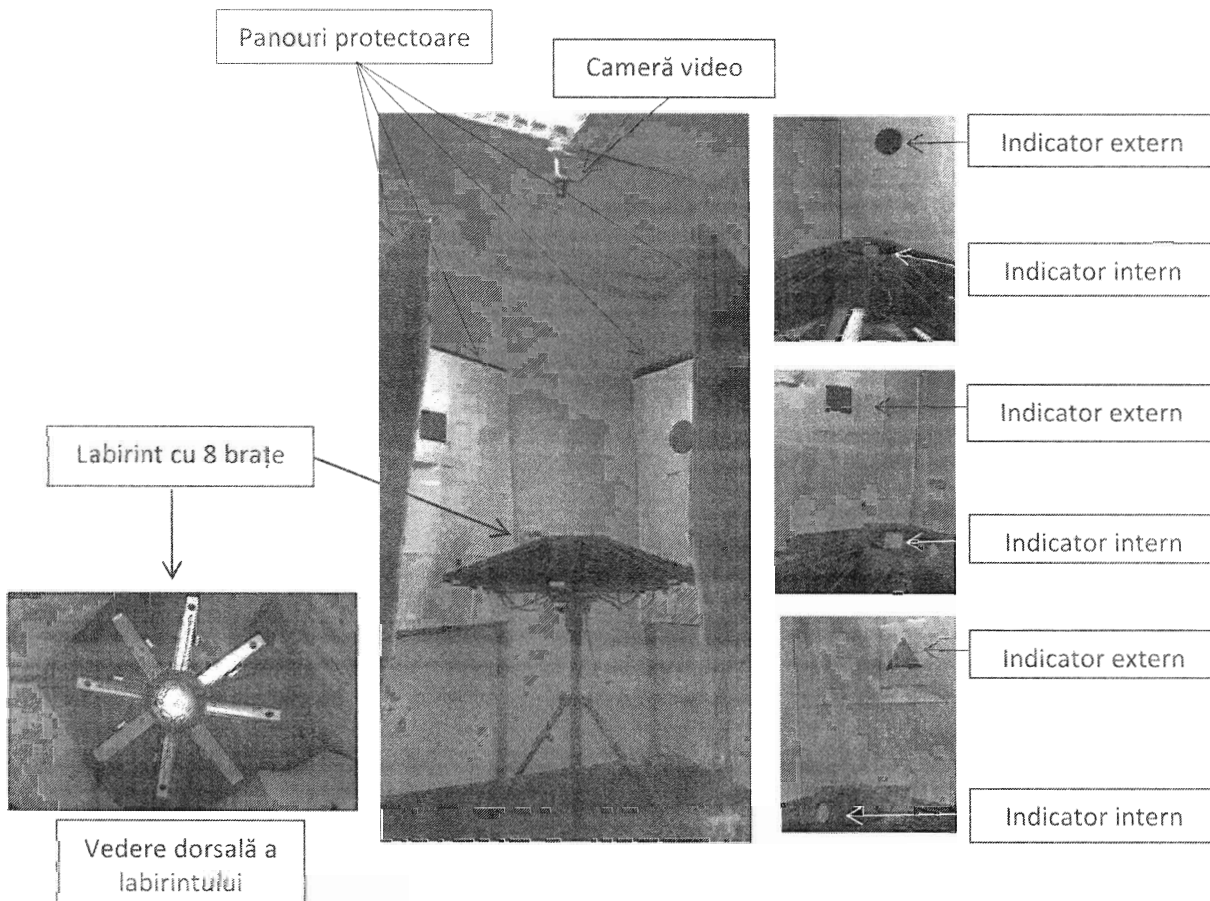


Figura 1. Dispozitivul experimental bazat pe labirintul radial cu opt brațe bazat pe recompense alimentare. Brațele marcate cu gri din vederea dorsală a labirintului reprezintă brațele cu recompense alimentare.

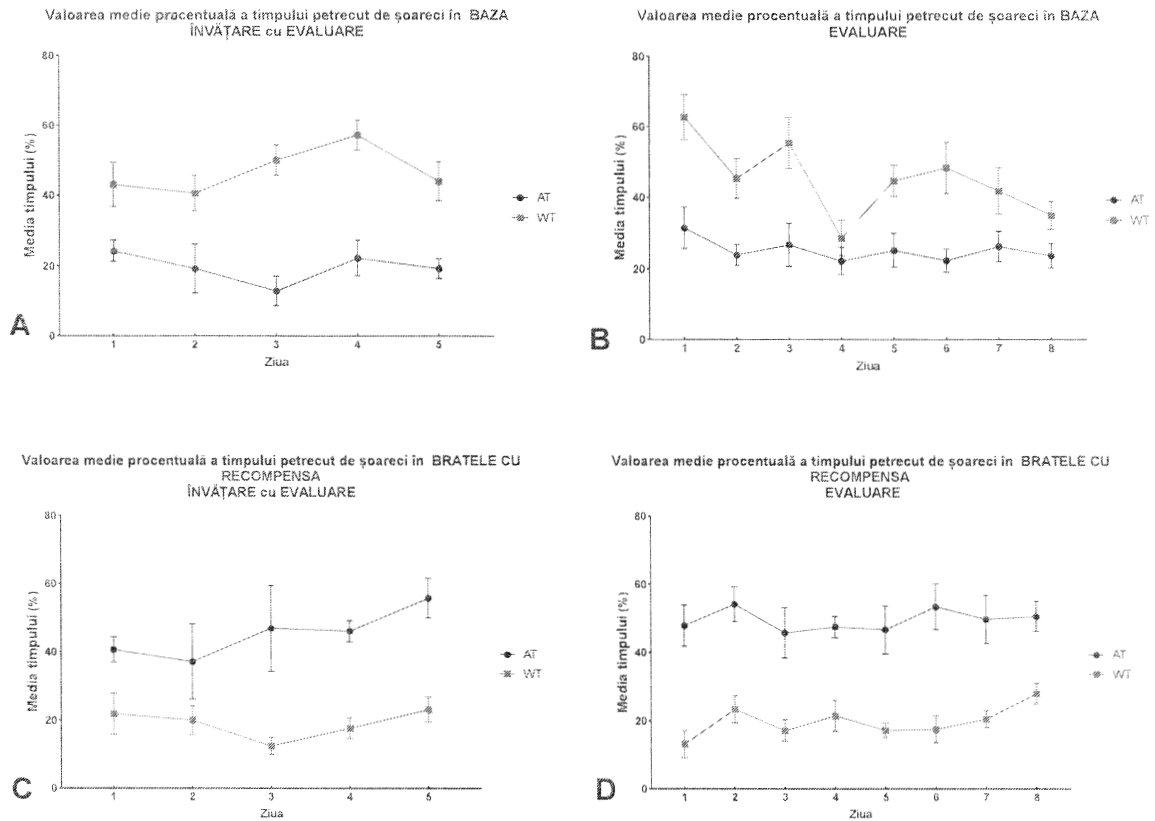


Figura 2. Reprezentarea grafică a procentului de timp petrecut de șoareci în zonele labirintului (bază și brațe) în faza de învățare cu evaluare (A și B) și în faza de evaluare (C și D).

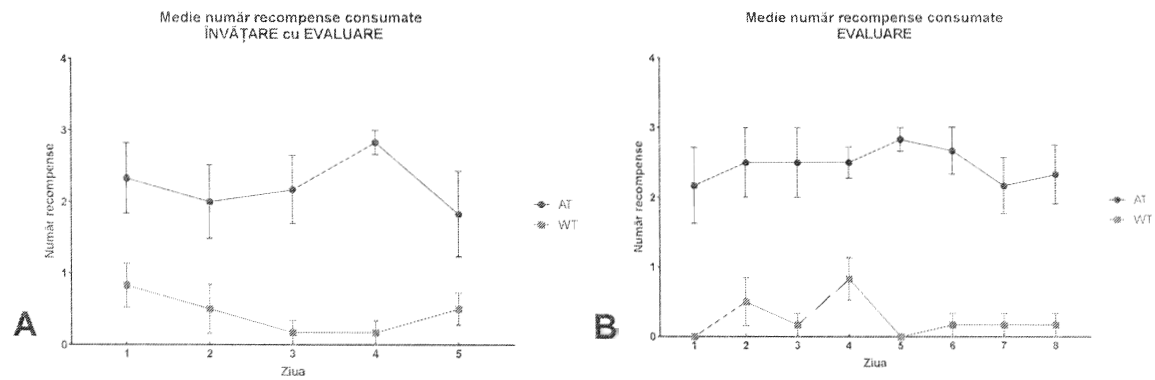


Figura 3. Reprezentarea grafică a numărului de recompense consumate de șoarecii transgenici AT (negru) și de șoarecii WT (gri) în faza de învățare cu evaluare (A), și în faza de evaluare (B).

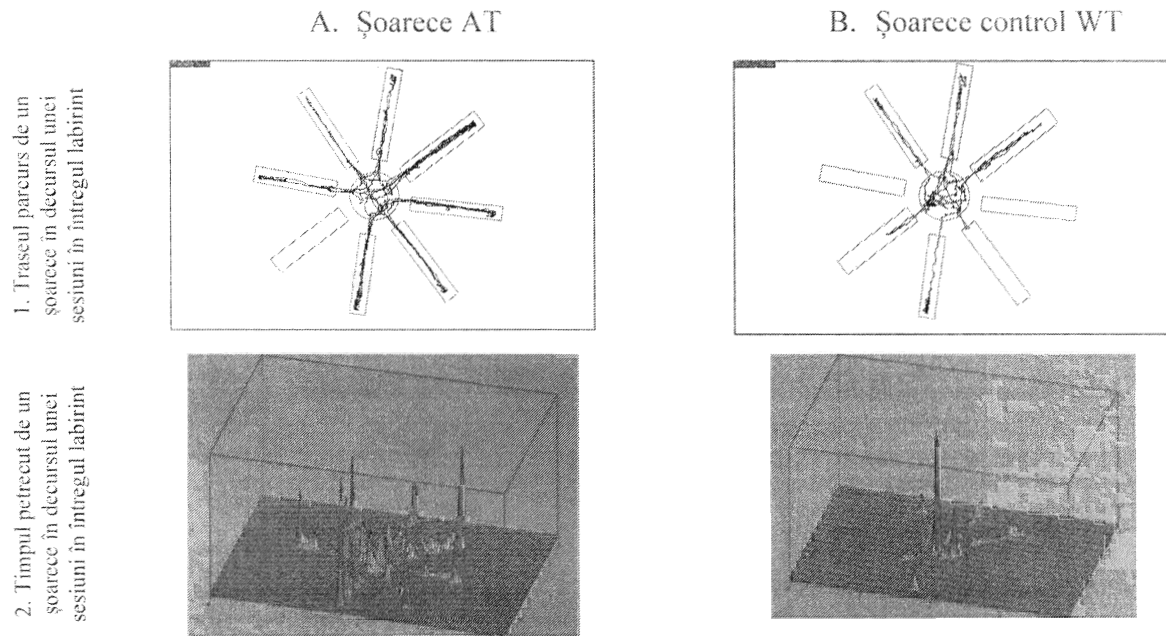


Figura 4. Harta activității unui șoarece transgenic AT (A), comparativ cu un șoarece WT (B). Imaginile 1A și 1B reprezintă traseul parcurs de un șoarece în decursul unei sesiuni în întregul labirint. Imaginile 2A și 2B reprezintă timpul petrecut de un șoarece în decursul unei sesiuni în întregul labirint.