



Universidad de Navarra
Facultad de Farmacia

**ESTUDIO DE LAS PRINCIPALES VÍAS RESPONSABLES DEL
EFECTO TERAPÉUTICO DEL SILDENAFILO SOBRE EL
DETERIORO COGNITIVO DEL RATÓN DE SENESCENCIA
ACELERADA SAMP8**

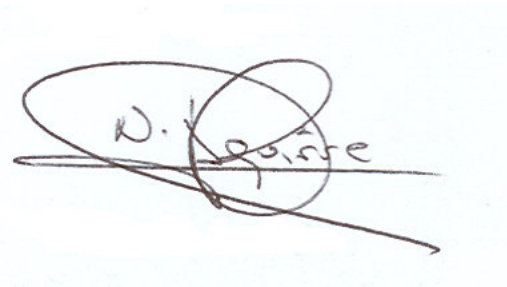
Lourdes Orejana Martín

**ESTUDIO DE LAS PRINCIPALES VÍAS RESPONSABLES DEL
EFECTO TERAPÉUTICO DEL SILDENAFILO SOBRE EL
DETERIORO COGNITIVO DEL RATÓN DE SENESCENCIA
ACELERADA SAMP8**

Memoria presentada por D^a Lourdes Orejana Martín para aspirar al grado de Doctor por la
Universidad de Navarra

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Farmacología y
autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, Abril de 2012



Fdo: Dr. Norberto Aguirre García



Fdo: Dra. Elena Puerta Ruiz de Azúa

*“Un pequeño paso para el hombre,
un gran salto para la humanidad”*

Neil Armstrong

A mi tía Rosa

A mi familia

Este trabajo ha sido llevado a cabo con el esfuerzo y el apoyo de muchas personas. Por eso quiero dejar aquí una muestra de sincero agradecimiento para todos aquellos que han colaborado, de una manera u otra, para que esto sea posible aunque lo que aquí aparece escrito no pueda representar ni la mitad de todo lo que les debo. A todos los que aquí aparecen nombrados y a muchos más: GRACIAS.

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Berta Lasheras, por abrirme las puertas del departamento de Farmacología, por la confianza que ha depositado en mí y por las continuas muestras de interés que me ha ido mostrando durante todo este tiempo tanto en el plano profesional como en el personal.

A los directores de este trabajo, en primer lugar, al Dr. Norberto Aguirre: gracias Popi, por haber confiado en mí desde el primer día y por haberme brindado la oportunidad de embarcarme en este proyecto. Porque ya en la primera entrevista que tuvimos, me mostraste un panorama apasionante que para mí era desconocido: la ciencia. Gracias por haberme enseñado que hay que emplear todas las fuerzas cuando se quiere conseguir algo. Gracias por todo lo que he aprendido de ti en el ámbito de la ciencia y en el personal, que es impagable.

En segundo lugar, quería agradecer a la Dra. Elena Puerta. Gracias Elena, porque contigo ha sido posible llevar a cabo este trabajo hasta el final mimando hasta el más pequeño detalle. Por todo el cariño que has puesto en este trabajo desde el primer día que puse un pie en el laboratorio. Por poner todo tu esfuerzo y sacrificio logrando así que este camino haya sido mucho más fácil de lo que se presentaba; porque incluso aunque hayas estado a muchos kilómetros de distancia, siempre parece que has estado tan cerca. Porque sabes mostrar siempre un entusiasmo enorme en todo, por la seguridad que a cada paso me has ido transmitiendo. Por todo lo que de ti he aprendido a nivel profesional y sobre todo en el plano personal. Porque además de una muy buena directora, eres una gran amiga y por tantas cosas más: MUCHAS GRACIAS.

Sin duda, este trabajo ha sido posible gracias al buen ambiente que he encontrado siempre en el laboratorio. Pienso que puedo decir, sin miedo a equivocarme, que “el depar de Farma” es el mejor departamento. Gracias porque desde el principio, todos me acogisteis con gran cariño. En primer lugar, quiero

agradecer a los que os encontráis en ese “cuartito” que dicen que ahora es “un poco aburrido”. Gracias Eli, porque siempre he encontrado en ti, ese punto de locura necesario para salir adelante en los momentos más duros de este camino; por todos los planes que has ido sugiriendo que creo que a todos nos han servido para ir desconectando cuando era necesario. Gracias también, porque has hecho que pierda el miedo a los perros, tarea que ha sido un poco complicada... “Marti”, gracias por todas las risas que nos hemos echado, sobre todo a raíz de “aquel tratamiento” por el que compartimos largas horas en CIFA y (¿quién me lo iba a decir?) al que tanto tengo que agradecer por haberte conocido más. Gorka, muchas gracias a ti también y, de manera especial, porque en los momentos más difíciles siempre has estado dispuesto a escucharme y a ayudarme con tus consejos y en todo lo que hiciera falta. Porque siempre que lo he necesitado, has sacado tiempo para oír mis tonterías y aguantarme. Y, ¡cómo no! gracias a ti, Luci, porque he tenido la suerte de que hayas sido “mi compañera de tesis” y de poder ir compartiendo a cada paso, muchas alegrías y tantas otras cosas; gracias por nuestras largas conversaciones de camino a casa y por tu valentía al preguntarme cada día: “¿qué tal?” sabiendo todo el tiempo que podría llevarte escuchar la respuesta. Para este cuarteto espero que aunque la vida nos lleve por caminos muy distintos, siempre nos quede- además de los recuerdos compartidos juntos durante estos años en el depar- la amistad que hemos ido forjando.

Y por supuesto, quiero agradecer el punto divertido de las incorporaciones recientes al depar. A Manuel, gracias por tus bromas aunque a veces de primeras no haya sabido muy bien cómo reaccionar; a Xabi, porque eres un friki sin remedio; a María, porque en ti he encontrado un gran apoyo madrileño, te deseo muchos descubrimientos de nuevas “cascadas” que te llenen de éxitos; Merche, gracias porque siempre has estado dispuesta a ayudarme cuando era necesario. A Marta y a Jorge: mucho ánimo en este camino que estáis empezando, que ya sé que habéis comenzado con muy buen pie. Gracias a ti también Mikel, porque has sabido sacarme siempre una sonrisa incluso en los días en los que parecía que era imposible.

Este departamento, ha sido desde el primer día y durante estos 4 años como mi segunda casa. Por esto, me gustaría aprovechar para agradecer a todos los que han hecho que así fuera. En primer lugar, gracias a Rosa y a Mariaja, porque en todos estos años cada día os habéis preocupado por mí, sobre todo en esta etapa final.

Gracias Mari Luz porque, sin ti, el depar no sería lo que es. Porque siempre te interesas por todos y por todo lo de cada uno de nosotros. A Idoia y a Guada porque aportáis siempre aire nuevo cada vez que llegáis al café. Gracias Luis porque siempre estás sonriente, incluso los sábados por la mañana, cuando vienes a trabajar. Gracias a ti Sandra por todo tu apoyo y ayuda a nivel profesional, pero sobre todo porque en estos años- y en especial en este último- has sido como una madre para mí. Gracias por todos los buenos ratos que hemos podido pasar juntas, intercambiando opiniones y aceptando las sugerencias que me has ido dando con tus buenos consejos. Pili gracias a ti, porque por tu trabajo tan bien hecho siempre está todo en el lugar adecuado en el momento en el que lo necesitamos. No podía olvidarme de “la Marquitos”: gracias Beíta, porque siempre tienes la puerta de tu despacho abierta para cualquier cosa que me hace falta; por todas las horas de prácticas y risas que hemos compartido...En resumen, muchas gracias a todos.

No podía dejar de agradecer a todos los que han pasado por el depar durante estos años. Gracias a todos los que me vieron llegar y tuvieron tanta paciencia conmigo: a Barbi porque siempre has tenido para mí la palabra adecuada, por “ese gran consejo” que me diste nada más empezar a hacer la tesis. A “la Nati”, por tu sonrisa diaria en mis comienzos en el labo. A Álvaro, por las continuas preguntas científicas que solías plantearme, haciéndome pensar y por reírte siempre de mis chistes, aunque a veces fueran tan malos. A Maite, por tu paciencia en todo lo que me has ido enseñando y por todo lo que has querido que comparta contigo. A Eva, por traernos el aire europeo que nos faltaba en el labo. A ¡Vero!, porque en el tiempo que estuvimos juntas además de trabajar muy compenetradas, nos reíamos a carcajadas; gracias por tu tiempo y por estar siempre para echarme una mano cuando lo necesitaba. Quisiera agradecer la suerte que tuve de conocer a “las italianas” que estuvieron de estancia: a Sara, gracias por tu amabilidad y simpatía; y a Ale, gracias por tu alegría, por tu manera de trabajar que tanto me enseñó y por todo lo que compartimos aquí, sobre todo en CIFA; porque he conocido a una gran persona y una buena amiga. Lola, como no nombrarte... ¡aúpa las madrileñas! A ti te tengo que agradecer toda la ayuda que me has prestado con mis conocimientos de inglés, las meriendas que hemos compartido en estos meses que estuviste y el entusiasmo con el que cada día me preguntabas por mi trabajo. A Fer, “el alemán”, porque en el poco

tiempo que estuviste, nos enseñaste que los alemanes no son tan cuadriculados. A Gonzalo, gracias por tu serenidad y paciencia cada vez que te he pedido usar el ordenador. Un agradecimiento especial para ti, Trini, que en el tiempo que estuviste nos enseñaste a trabajar con alegría y optimismo. Además, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que han pasado temporalmente por el departamento: masterianos, alumnos internos...

También quisiera agradecer a Juan y demás personas con las que he coincidido en el animalario por su ayuda con los animales y su compañía los largos días en CIFA. A la gente del edificio de investigación que ha hecho que venir a trabajar cada día sea tan agradable, sobre todo a las "chicas de bioquímica", que incluso han logrado convertir el momento de revelar en el mejor momento del día, porque saben ver bandas dónde nos las hay...

Mi más sincero agradecimiento a todos los que habéis me habéis ayudado desde el CIMA, a Mar, Ana Rico, Carol y demás equipo. Gracias, por todo vuestro apoyo.

A todas las personas con las que he compartido las "horas duras" de este trabajo. Gracias a "las Cristinas" y a Ana por animarme a seguir con la investigación desde el principio y porque SIEMPRE habéis estado ahí, cuando os he necesitado.

Quisiera agradecer también "al estupendo grupo de Cizur" el apoyo y el interés que ha mostrado en todo momento y por ayudarme a que esta última etapa de la tesis haya pasado casi sin darme cuenta.

Gracias a mis compañeras de facultad, sobre todo a Clara y a Blanqui, porque a pesar de la distancia, nos hemos podido ir siguiendo casi día a día.

Y dejo para el final las personas más importantes y a las que dedico este trabajo: mi familia.

A mi abuela porque siempre ha estado en casa cuidando de cada uno como si fuéramos el único. A mis hermanos: Carmen, María, Isa, Alber, Anita, Javi, Alvarate, Inmi, Inés y Josete, gracias por vuestro apoyo en todo momento, por confiar en mí y haber estado ahí siempre que os he necesitado. Por todos los buenos momentos que hemos pasado desde siempre y más durante estos últimos años con la

llegada de los sobrinos y de las nuevas tecnologías, con los que llenáis de alegría cada momento...GRACIAS.

A mis padres, porque siempre he podido contar con vosotros, con vuestro apoyo y con vuestro GRAN ejemplo de vida. Por haberme enseñado que trabajando y con esfuerzo se consiguen las cosas y porque nunca me ha faltado una oportunidad. Porque siempre me he encontrado un abrazo en casa que me ha dado fuerzas para seguir adelante y porque sé que sin vosotros nada de esto hubiera sido posible. Muchas gracias.

De nuevo, MUCHAS GRACIAS a todos porque entre todos lo hemos conseguido.

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la financiación de la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra.

Abreviaturas más empleadas

%: porcentaje

μg: microgramos

μl: microlitros

μm: micras

3xTgAD: modelo de ratón triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer

Aβ: péptido β-amiloide

Aβ₄₀: péptido β-amiloide de 40 aminoácidos

Aβ₄₂: péptido β-amiloide de 42 aminoácidos

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AICD: fragmento carboxi-terminal intracelular de la proteína precursora del β-amiloide

Akt: proteína cinasa tipo B

AME: actividad motora espontánea

AMPc: adenosina monofosfato cíclica

ApoE: apolipoproteína E

APP: proteína precursora del β-amiloide

ARNm: ARN mensajero

BACE: β-secretasa

BHE: barrera hematoencefálica

C83: fragmento carboxilo terminal de 83 aminoácidos

C99: fragmento carboxilo terminal de 99 aminoácidos

CaMKII: Calcio/Calmodulina proteín cinasa II

Cdk5: cinasa dependiente de ciclina 5

D-JNKI-1: péptido inhibidor de la cinasa JNK

EA: enfermedad de Alzheimer

EAE: enfermedad de Alzheimer esporádica

EAF: enfermedad de Alzheimer de origen familiar

EP: enfermedad de Parkinson

ERO: especie reactiva de oxígeno

FHP: filamento helicoidal pareado

GABA: ácido γ-aminobutírico

GCs: guanilato ciclasa soluble

GFAP: proteína acídica glial fibrilar
GMPc: guanosina monofosfato cíclica
GPx: glutatión peroxidasa
GR: receptor de glucocorticoides
GSH: glutatión
GSK-3 β : cinasa glicógeno sintasa 3 β
GTP: guanosina trifosfato
i.p. : intraperitoneal
JNK: cinasa N-terminal de c-Jun
Lys: residuo de lisina
MAO: monoaminooxidasa
MAPKK4: proteína cinasa cinasa 4 activada por mitógenos
MARK: cinasa reguladora de la afinidad de microtúbulos
MDMA: 3,4-metilendioximetanfetamina
Mnsod: manganeso superóxido dismutasa
MR: receptor de mineralocorticoides
MWM: test del laberinto acuático de Morris
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintasa
ONF: ovillo neurofibrilar
P38: cinasa proteica p38 activada por mitógeno
PDE5: fosfodiesterasa 5
PI3K: fosfoinositol 3 cinasa
PI3P: fosfatidil-inositol-3-fosfato
PKA: proteín cinasa A
PKC: proteín cinasa C
PKG: protein cinasa dependiente de GMPc
PS1: presenilina 1
PS2: presenilina 2
p-tau: proteína tau fosforilada
RAWM: laberinto acuático del brazo radial
RT-PCR: PCR a tiempo real
SAM: ratón de senescencia acelerada
SAMP: ratón con tendencia a la senescencia acelerada

SAMR: ratón resistente a la senescencia acelerada

Ser: residuo de serina

SNC: sistema nervioso central

Tg2576: modelo de ratón transgénico para la EA

Thr: residuo de treonina

vs: versus

Abbreviations in English

A β ₄₂: fragment of 42 amino acid of the amyloid β -peptide

AD: Alzheimer's disease

ANOVA: Analysis of variance

APP: amyloid precursor protein

A β : amyloid β peptide

BACE1: β -secretase

BDNF: brain derived neurotrophic factor

C83: APP carboxy-terminal fragment of 83 aminoacids

C99: APP carboxy-terminal fragment of 99 aminoacids

Cdk5: cyclin-dependent kinase 5

CNS: central nervous system

CREB: cyclic adenosine monophosphate response element-binding

D-JNKI-1: JNK inhibitor

FDA: food and drug administration

GFAP: glial fibrillary acidic protein

GSK-3 β : glycogen synthase kinase-3 β

JNK: c-Jun NH₂-terminal kinase

mRNA: messenger ribonucleic acid

MWM: morris water maze

O.D.: optical density

PDE5: phosphodiesterase 5

Pmol: picomol

s: seconds

SAM: senescence accelerated mouse

SAMP: senescence accelerated mouse prone

SAMR: senescence accelerated mouse resistant

SEM: standard error of the mean

TBS: tris buffered saline

TM: trade mark

ÍNDICE

Capítulo I: Introducción	1
1. El proceso de envejecimiento	1
2. El Ratón de Senescencia Acelerada (SAM)	3
2.1. Introducción	3
2.2. Desarrollo de la cepa SAM	4
3. El ratón SAMP8	6
3.1. Introducción	6
3.2. Alteraciones en la conducta en el ratón SAMP8	7
3.3. Características neuropatológicas presentes en el ratón SAMP8	11
4. El sildenafil.....	24
Bibliografía.....	31
Capítulo II: Planteamiento y Objetivos	49
Capítulo III: Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model	55
Resumen	59
Abstract	60
1. Introduction	61
2. Materials and Methods.....	62
2.1. Drugs and chemicals.....	62
2.2. Animals, treatments and experimental design	62
2.3. Morris Water Maze test (MWM)	63
2.4. Western blot analysis.....	64
2.5. Statistical analysis.....	64
3. Results.....	65
3.1. Effect of sildenafil on spatial learning and memory deficits in SAMP8 mice	65
3.1.1. Effect of sildenafil on performance of 6 month-old SAMP8 and SAMR1 mice in the MWM test.....	65
3.1.2. Effect of sildenafil on performance of 9 month-old SAMP8 and SAMR1 mice in the MWM test.....	68
3.2. Effect of sildenafil on tau pathology	70
3.2.1. Role of Cdk5/p25-p35 pathway.....	70
3.2.2. Role of Akt/GSK-3 β pathway	72

4. Discussion	75
Disclosure statement	78
Acknowledgements.....	78
References	79

**Capítulo IV: Sildenafil decreases BACE1 and Cathepsin B levels and reduces
APP amyloidogenic processing in the SAMP8 mouse..... 87**

Resumen	91
Abstract.....	92
1. Introduction	93
2. Material and Methods	94
2.1. Drugs and chemicals.....	94
2.2. Animals, treatments and experimental design.....	94
2.3. Passive avoidance test	94
2.4. Preparation of protein extracts	95
2.5. Immunoblotting.....	95
2.6. Quantification of A β by ELISA	96
2.7. Immunohistochemistry	96
2.8. Statistical analysis.....	97
3. Results.....	97
3.1. Effects of sildenafil on learning and memory deficits of SAMP8 mice in the passive avoidance test	97
3.2. Effects of sildenafil on BACE1 levels and on Cdk5/p25-p35 pathway	98
3.3. Effects of sildenafil on Cathepsin B levels and on Akt/GSK-3 β pathway.....	101
3.4. Sildenafil reduces APP amyloidogenic processing and A β ₄₂ burden.....	103
3.5. Sildenafil decreases GFAP expression	103
4. Discussion	105
Acknowledgements.....	108
References	109

**Capítulo V: Implication of JNK pathway on tau pathology and cognitive decline in
a senescence-accelerated mouse model 117**

Resumen	121
Abstract.....	122
1. Introduction	123

2. Experimental procedures	124
2.1. Drugs and chemicals.....	124
2.2. Animals, treatments and experimental design	124
2.3. Morris Water maze test (MWM)	125
2.4. Western blot analysis.....	126
2.5. Statistical analysis.....	126
3. Results	127
3.1. Sildenafil reduces JNK activity and c-Jun phosphorylation in 6-month old SAMP8 mice.....	127
3.2. Effect of D-JNKI-1 on spatial learning and memory in SAMP8 mice	128
3.3. Effect of D-JNKI-1 on tau pathology	130
4. Discussion	131
References	135
Capítulo VI: Discusión general	141
Bibliografía.....	153
Capítulo VII: Conclusiones	159

CAPÍTULO I

Capítulo 1

Introducción

1. El proceso de envejecimiento

El **envejecimiento** es el conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas que aparecen con el paso del tiempo en los seres vivos. Este proceso supone una disminución de la capacidad de adaptación de cada uno de los órganos, aparatos y sistemas, así como de la capacidad de respuesta a los distintos agentes nocivos que inciden sobre el individuo.

El envejecimiento ha sido motivo de preocupación en los distintos países desde hace años. De hecho, el 14 de diciembre de 1990 la Asamblea General de las Naciones Unidas designó el 1º de octubre Día Internacional de las Personas de Edad. Más recientemente, el año 2012 ha sido designado por la Unión Europea como “el Año Europeo del Envejecimiento Activo y de la solidaridad intergeneracional”. El objetivo es animar a los estados miembros a encontrar soluciones innovadoras para los problemas económicos, sociales y sanitarios de una población que envejece e invitar a las personas mayores a seguir jugando un papel importante en la sociedad, además de fortalecer la solidaridad intergeneracional.

En el siglo XX y según datos de la OMS, la esperanza de vida ha ido aumentando significativamente a lo largo de los últimos años. De hecho, en la actualidad Europa occidental y Japón, con el 20 % de la población mayor de 60 años, constituyen el conjunto de países más envejecidos del planeta. Como consecuencia, el número de personas mayores de 60 años, que era de alrededor de 600 millones en el año 2000, se prevé que llegará a casi 2.000 millones en el 2050. Este aumento será más notable y rápido en los países en desarrollo. Una transformación demográfica mundial de este tipo tiene profundas consecuencias en cada uno de los aspectos de la vida individual, comunitaria, nacional e internacional.

El envejecimiento de la población puede considerarse un éxito de las políticas de salud pública y del desarrollo socioeconómico, aunque también es un reto para toda sociedad ya que debe adaptarse a esta nueva realidad. Dicho proceso de envejecimiento se caracteriza por una pérdida funcional generalizada que aumenta tanto el riesgo de mortalidad como el de padecer ciertas enfermedades, como las cardiovasculares, el cáncer, la diabetes, la hipertensión y una variedad de **enfermedades neurodegenerativas**, siendo las más frecuentes la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad Alzheimer (EA).

Las observaciones registradas sobre el cambio que experimentan los individuos con la edad son tan variadas que han dado origen a numerosas teorías sobre el envejecimiento.

Los radicales libres, el sistema endocrino, el genoma y la acumulación de distintas sustancias producidas por el metabolismo celular son, entre otros, distintos factores que se han identificado como posibles responsables del envejecimiento del individuo. Todas estas hipótesis parecen sugerir que el envejecimiento del organismo no ocurra por un único motivo, sino por la suma de múltiples factores y procesos cuyo balance general determina que el individuo envejezca.

En los últimos 20 años, parte de la comunidad científica ha realizado un gran esfuerzo para lograr entender los procesos moleculares y celulares que tienen lugar durante el envejecimiento y para estudiar los mecanismos que subyacen a las alteraciones del sistema nervioso central (SNC) asociadas a la edad. Los numerosos estudios llevados a cabo en este ámbito permiten afirmar que durante el envejecimiento del cerebro hay una pérdida gradual y progresiva de la habilidad cognitiva, lo cual puede interferir con la capacidad del individuo para llevar a cabo sus actividades profesionales o sociales, fenómeno que se conoce con el nombre de demencia.

Actualmente, la **demencia** se considera la tercera enfermedad más costosa detrás de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Dentro de los distintos tipos de demencia, la EA es la causa más frecuente de esta enfermedad en ancianos. Se calcula que el coste medio anual por paciente de EA en España es de 19.000 €. El factor que determina en mayor medida los costes del gasto sanitario son los cuidados que precisa un paciente anciano con una enfermedad discapacitante, que se extienden no sólo al propio paciente sino a los familiares al cuidado del enfermo. Este gasto crece de forma exponencial a medida que la enfermedad progresa, por lo que cualquier terapia que consiguiese ralentizar la progresión de la enfermedad podría repercutir significativamente en los costes de la misma. Todo esto, unido a la ausencia de un tratamiento curativo para las distintas enfermedades neurodegenerativas, justifica la necesidad de investigar sobre los procesos patológicos que se producen durante el envejecimiento, intentando así, con los conocimientos adquiridos, determinar dianas terapéuticas que puedan estimular el desarrollo de nuevos fármacos que constituyan un tratamiento curativo de estas enfermedades asociadas a la edad.

2. El Ratón de Senescencia Acelerada (SAM)

2. 1. Introducción

Un paso crucial en el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas para prevenir o enlentecer la progresión de las enfermedades neurodegenerativas como la EA podría ser lograr un mayor conocimiento sobre los mecanismos implicados en el envejecimiento del cerebro, así como estudiar la cronología de aparición de los mismos. Para poder analizar estos mecanismos es importante establecer un modelo animal con características similares a las observadas en los humanos. En la actualidad, uno de los problemas más frecuentes con los que se encuentran los investigadores a la hora de estudiar las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento son los modelos animales a emplear. Esto se debe, en primer lugar, al **largo tiempo** que se debe esperar para que un animal se considere “envejecido”. Por ejemplo, en el caso del ratón C57BL/6 deben transcurrir más de 12 meses para poder decir que “está envejecido”. Si se trata de un mono, deben transcurrir 21 años. Esta desventaja en el tiempo de espera hace que las investigaciones de estas enfermedades sufran una ralentización y no puedan ser llevadas a cabo en menor tiempo. A este aspecto negativo se le suma el gasto que supone el mantenimiento de los animales bajo condiciones ambientales específicas durante tanto tiempo. En segundo lugar, merece la pena señalar que la mayoría de los modelos animales para el estudio de la EA se restringen a la **sobreexpresión de genes** con mutaciones específicas asociadas a la “*familial Alzheimer disease*” o EA *familiar* (EAF), que constituye menos del 5% del total de los casos de la EA. A diferencia de esta EAF, la mayor parte de los pacientes de EA diagnosticados presentan lo que se conoce como “*sporadic Alzheimer disease*” o EA *esporádica* (EAE) que se desarrolla de manera espontánea sin una causa genética determinada y aparece en individuos de edad más avanzada que en los casos de EAF.

Por estas razones, los investigadores están continuamente en la búsqueda y optimización de nuevos modelos animales para el estudio de los procesos de envejecimiento y neurodegeneración. Con este fin, a partir de la cepa AKR/J y mediante una selección de ratones en función del fenotipo de envejecimiento que presentaban, se desarrolló el ratón de senescencia acelerada “Senescence Accelerated Mouse”, conocido por las siglas SAM (Takeda y col., 1981). Desde que en 1981 se publicara en la revista “*Mechanisms of Ageing and Development*” el primer artículo sobre el desarrollo de esta cepa, se están llevando a

cabo numerosos estudios en los que se utiliza este modelo de ratón SAM en diversos campos de la ciencia relacionados con el envejecimiento.

2.2. Desarrollo de la cepa SAM

En 1968 algunas parejas de ratones de la cepa **AKR/J** fueron donados por los Laboratorios Jackson (Estados Unidos) al profesor Takeda, del departamento de Patología de la Universidad de Kyoto. Alrededor del año 1975 y tras sucesivos cruces de estos ratones, el profesor Takeda observó que algunas camadas presentaban, de manera temprana en la edad, un fenotipo envejecido. Entre sus principales características se incluían: pérdida en la cantidad y en el brillo del pelo, lordocifosis, lesiones perioftálmicas y un descenso en la actividad y en la esperanza de vida. Mediante cruces selectivos de ratones hermanos que presentaban este fenotipo y después de unas cuantas generaciones, se obtuvieron unas camadas de ratones que presentaban un envejecimiento acelerado y una corta esperanza de vida. Cinco de estas camadas fueron seleccionadas como progenitoras de ratones “con tendencia al envejecimiento acelerado”, cepa que se conoce por sus siglas en inglés “**SAMP**” (Senescence Accelerated Mouse Prone).

Paralelamente a la cría de esta cepa de ratones SAMP, se observó el desarrollo de otras camadas de ratones que no presentaban este fenotipo de envejecimiento y que tenían una esperanza de vida mayor. Tres de estas camadas que mostraban un envejecimiento normal se seleccionaron para ser progenitoras de ratones “resistentes a ese envejecimiento acelerado” o ratones “**SAMR**” (Senescence Accelerated Mouse Resistant) (Miyamoto, 1997; Takeda y col., 1981).

Una vez establecidas las cepas progenitoras SAMP y SAMR, se procedió a la cría selectiva de los ratones en función del grado de envejecimiento, de la esperanza de vida y del fenotipo patológico asociado a la edad (Hosokawa y col., 1997).

Finalmente, el modelo de ratón SAM quedó establecido. Como se observa en la figura 1, incluye 9 subcepas de ratones pertenecientes a la cepa SAMP y 3 subcepas dentro de la cepa SAMR. En la Fig. 1 se presenta la genealogía de las cepas SAM. Además, se indica el desarrollo de cada cepa desde la cepa original AKR/J a través de los progenitores de las cepas SAMP (P-1, -2, -3, -4 y -5) y las cepas SAMR (R-1, -2 y -3) (revisado por Takeda, 2009).

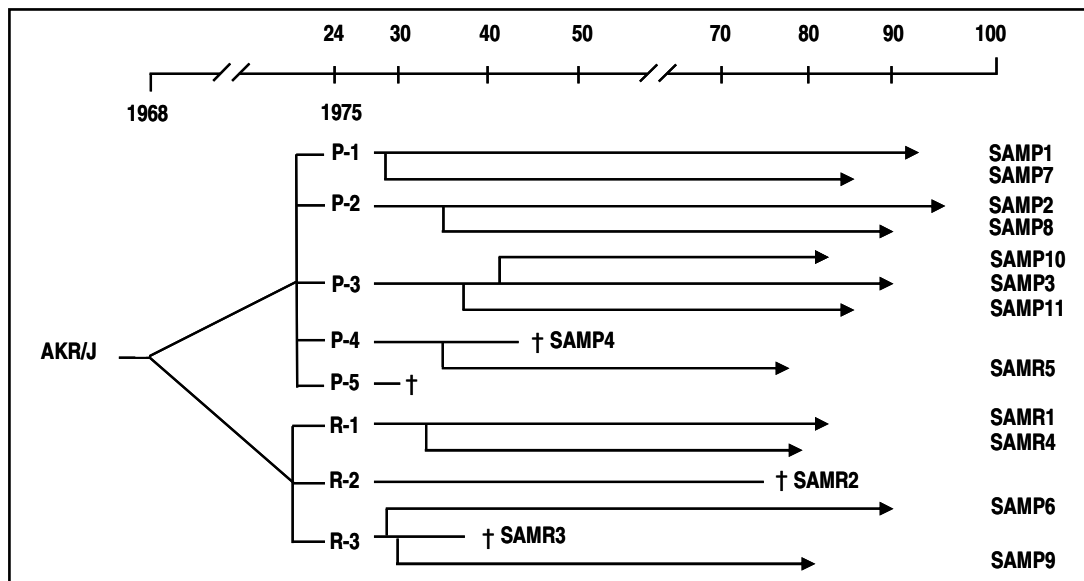


Figura 1. Desarrollo del linaje de los ratones SAM. Cada cepa SAM parte inicialmente de la cepa original AKR/J y sigue su desarrollo a través de los progenitores SAMP (P-1, -2, -3, -4, -5) y SAMR (R-1, -2, -3). † significa cría sin éxito o el cese de la misma. (Adaptada de Takeda y col., 1997).

De acuerdo con los datos obtenidos en 1994, la supervivencia media de los ratones SAMP es de 9,7 meses, un 40% menos que la de las cepas de ratones SAMR (16.3 meses). Otro dato a tener en cuenta es que la puntuación de envejecimiento para las cepas SAMP es de 7.97, el doble que la de las cepas SAMR (3.94) (Takeda y col., 1991; 1994).

A su vez, cada subcepa P y R presenta determinadas alteraciones que quedan resumidas en la Tabla 1. Es importante subrayar que la mayoría de los fenotipos patobiológicos observados en los ratones SAM son trastornos asociados a la edad, cuya incidencia y severidad aumenta en función de la misma. Además, la mayoría de las alteraciones que aparecen con la edad en el ser humano (osteoporosis, osteoartritis, cataratas, inflamación de los pulmones, deterioro de la capacidad auditiva...) y que son descritas como “una consecuencia directa de un envejecimiento fisiológico” (Cotran y col., 1989) también se encuentran presentes en las distintas subcepas de ratones SAMP. Asimismo, se incluyen diversos aspectos neurobiológicos, como déficits en la memoria y en el aprendizaje, atrofia del cerebro, alteraciones emocionales o del ritmo circadiano (Takeda, 1999; Takeda y col., 1997) que prueban la validez del ratón SAM como modelo animal para la investigación en el campo del envejecimiento (revisado por Takeda, 2009).

Tabla 1. Las cepas SAM y sus características fenotípicas. (Adaptada de Butterfield y Poon, 2005).

Cepa SAM	Características fenotípicas
P1	Amiloidosis senil (periférica), alteración del sistema inmune y del sentido del oído Atrofia de la retina, hipertensión vascular, hiperhinchazón de los pulmones Contracción del riñón
P2	Amiloidosis senil secundaria (periférica), fallo del sistema inmune
P3	Artrosis degenerativa
P6	Osteoporosis senil
P7	Amiloidosis senil, timoma
P8	Déficits en el aprendizaje y en la memoria; depósitos del péptido A β asociados a la edad. Ansiedad, alteración de la respuesta inmune
P9	Cataratas asociadas a la edad
P10	Alteraciones del aprendizaje y de la memoria relacionadas con la edad. Atrofia cerebral, depresión asociada a la edad.
P11	Endurecimiento de la capa media de la aorta torácica asociada a la edad. Amiloidosis senil, contracción del riñón
R1	Envejecimiento normal con linfoma no tímico y sarcoma histiocítico, quistes ováricos
R4	Envejecimiento normal con linfoma no tímico y sarcoma histiocítico
R5	Envejecimiento normal con colitis

3. El ratón SAMP8

3.1. Introducción

De todas las subcepas establecidas por sus características fenotípicas específicas, la subcepa SAMP8 ha ido cobrando interés en la investigación. De hecho, el ratón SAMP8 se ha propuesto como un buen modelo para el estudio del envejecimiento y de las enfermedades neurodegenerativas asociadas al mismo, en particular la EA, ya que presenta déficits en el aprendizaje y en la memoria con la edad (Flood y Morley, 1998) y las principales alteraciones neuropatológicas y neuroquímicas que han sido descritas en pacientes de EA (revisado por Pallás y col., 2008). Entre estas alteraciones se destacan el estrés oxidativo, hiperfosforilación de la proteína tau, un aumento del péptido A β y neuroinflamación, aspectos que se desarrollan en los apartados siguientes del presente trabajo. Otra ventaja que merece

la pena destacar de este modelo es que parece representar de manera más real que otros modelos animales transgénicos para la EA, la cronología de aparición de estos marcadores de la enfermedad, hecho que queda reflejado en la Tabla 2. Además, desde que se comenzó su cría, no se ha observado la presencia de otras alteraciones como retraso en el crecimiento, malformación, parálisis de los miembros, temblores o convulsiones (Takeda, 2009), lo que permite y facilita su utilización en los distintos test de aprendizaje y memoria.

Tabla 2. Comparación de la cronología de aparición de los principales marcadores histopatológicos y del déficit cognitivo que aparece en la EA, entre el ratón SAMP8 y distintos modelos animales transgénicos para la EA.

Fenotipo parecido EA	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses	> 12 meses
Déficit cognitivo (Hipocampal)		3xTg-AD	SAMP8		Tg 2576		
Estrés oxidativo	SAMP8 (3 M)			Tg 2576			
Amiloide		3xTg-AD			Tg 2576		SAMP8#
Fosforilación de tau		3xTg-AD	SAMP8 (5 M)				Tg 2576
Gliosis				SAMP8			Tg 2576

Las placas del péptido β -amiloide tienen lugar sobre los 18 meses. Los niveles del péptido soluble A β se detectan desde los 8 meses de edad. (Adaptada de Pallás y col., 2008).

3.2. Alteraciones de la conducta en el ratón SAMP8

En el envejecimiento normal y de un modo más severo en pacientes de EA, se ha observado que hay un declive progresivo de los procesos cognitivos relacionados con la memoria episódica (Mc Dowd y Craik, 1988; Ohta y col., 1981), la memoria de trabajo y la memoria espacial (Sharps, 1991; Weber y col., 1978). Los posibles mecanismos neuronales que subyacen a estas alteraciones de la conducta están en continua investigación. Se ha demostrado que el hipocampo, región cerebral muy plástica, es crucial en la modulación de la memoria episódica y de la memoria espacial, y es precisamente esta región una de las más sensibles al proceso de envejecimiento. Como consecuencia, con la edad disminuye la plasticidad del hipocampo provocando la aparición de las distintas alteraciones cognitivas (Driscoll y Sutherland, 2005).

3.2.1. Alteraciones cognitivas

Desde que, por primera vez, Miyamoto y col. (1986) observaron que los ratones SAMP8 presentaban déficits en la capacidad de aprendizaje y en la memoria, se han llevado a cabo numerosos estudios con el objetivo de esclarecer los mecanismos implicados en el declive cognitivo de estos ratones.

Estudios realizados mediante distintas pruebas de conducta han puesto de manifiesto que el deterioro de la capacidad cognitiva en el ratón SAMP8 se asemeja a las observadas en modelos animales transgénicos para la EA y en pacientes con esta enfermedad. Entre las diferentes pruebas de comportamiento utilizadas para el estudio de las alteraciones del ratón SAMP8 se encuentran:

- Pruebas de aprendizaje y de memoria espacial

El test del **Laberinto Acuático de Morris** o “**Morris Water Maze**” (MWM) es una prueba cognitiva dependiente del hipocampo. En este test de conducta se coloca al ratón en una piscina llena de agua que contiene una plataforma situada por debajo de la superficie del agua. El animal, para conseguir escapar del agua, que para él es un estímulo adverso, debe encontrar la plataforma. Además, en las paredes de la habitación donde se lleva a cabo el experimento se disponen una serie de pistas visuales gracias a las cuales el ratón consigue aprender y retener la localización de dicha plataforma (Brody y Holtzman, 2006). Esta prueba permite valorar el aprendizaje y la memoria espacial (Maguire y col., 2003), y es particularmente sensible a la hora de determinar los déficits cognitivos asociados a la edad y en la EA. De manera adicional, y mediante el uso de pruebas adicionales al test, como la prueba de “reversal”, puede medirse también la flexibilidad cognitiva del animal, esto es, la capacidad de reaprender nueva información (Morris, 1984; Shukitt-Hale y col., 1998). Así pues, mediante el uso de este test, se ha demostrado que el deterioro en la memoria espacial comienza aproximadamente a los 4 meses de edad en el ratón SAMP8 (Cheng y col., 2008; Flood y col., 1998; Ikegami y col., 1992).

Sin embargo, estudios en los que se utilizaron test más sensibles, como el **Laberinto Acuático del Brazo Radial**, han demostrado que el deterioro en la capacidad de aprendizaje y memoria espacial puede detectarse en los SAMP8 a los 3 y a los 5 meses de edad, respectivamente (Chen y col., 2004). En ambas pruebas, el deterioro del aprendizaje en los ratones SAMP8 se pone de manifiesto con un aumento del tiempo de latencia (tiempo que

tarda el ratón en encontrar la plataforma) en la fase de plataforma no visible, en comparación con la cepa control SAMR1.

- *Pruebas de aprendizaje asociativo*

En el **test de la evitación pasiva** el animal debe aprender a evitar un estímulo adverso (shock eléctrico), que aparece en un ambiente que para el animal es preferente (un compartimento oscuro), mediante la permanencia en un espacio no preferido por él (compartimento claro) (Lawlor y col., 2007; McGaugh, 1966; Senechal y col., 2007). Esta prueba se fundamenta en dos hechos: la preferencia de los roedores por los lugares oscuros y poco iluminados, y la capacidad de estos animales para recordar un estímulo desagradable. En este test se administra al animal un estímulo desagradable (descarga eléctrica) en la zona preferida (compartimento oscuro). En una exposición posterior, los animales, al recordar el estímulo adverso, tienden a quedarse en el compartimento claro o tardan más en acceder al oscuro.

En el **test de la evitación activa**, sin embargo, el animal deberá pasar del espacio donde se le proporciona el shock al compartimento en el que quedará a salvo. En el test de la evitación pasiva se ha demostrado que el ratón SAMP8, en comparación con la cepa control SAMR1, muestra un declive leve pero significativo en este tipo de aprendizaje (Miyamoto, 1997; Yagi y col., 1988), que puede detectarse desde los 2 meses y se hace más patente con el avance de la edad (Miyamoto y col., 1986). Con respecto al test de la evitación activa, el deterioro en la adquisición se detectó a los 12 meses de edad en los ratones SAMP8, frente a la buena respuesta de evitación que presentaron los ratones SAMR1 de la misma edad (Miyamoto y col., 1986). A través de estudios adicionales se ha comprobado que el deterioro cognitivo observado mediante este tipo de pruebas en los ratones SAMP8 no es consecuencia de una simple alteración de la función motora, sino fruto del declive de la capacidad de aprendizaje y de la memoria que presentan estos ratones (Miyamoto, 1997).

Otro test utilizado con la finalidad de medir el aprendizaje asociativo es el **test del miedo condicionado**. Este test es muy sensible para detectar el deterioro del aprendizaje ligado a las emociones, y proporciona información sobre la comunicación neuronal entre dos regiones cerebrales: la amígdala y el hipocampo. En este test, el roedor recibe una pequeña descarga eléctrica justo después de oír un tono acústico (miedo condicionado al tono) o simplemente después de permanecer un tiempo en una cámara de condicionamiento (miedo

condicionado al contexto). Se toma como medida de la memoria el tiempo de inmovilidad del ratón al recolocararlo más adelante en el mismo contexto en ausencia del shock. Mediante este test se ha puesto de manifiesto que el ratón SAMP8 a los 4 y 8 meses de edad, en comparación con su cepa control SAMR1, presenta menor miedo asociado al contexto (dependiente de hipocampo) (Ohta y col., 2001), mientras que no presenta alteraciones en la memoria asociativa (cuando se presenta sólo el tono). Esta información es relevante, puesto que en los pacientes de EA es el deterioro cognitivo dependiente del hipocampo el que también aparece de manera más temprana.

Por otro lado, en aquellos test en los que se motiva al ratón mediante comida, el deterioro observado es más suave en comparación con las alteraciones detectadas mediante los distintos test de evitación (Miyamoto, 1997).

A la vista de todos estos datos y estableciendo de nuevo la similitud con otros modelos de ratón para la EA y con los individuos que padecen esta enfermedad, los resultados sugieren que las pruebas cognitivas que se encuentran estrechamente relacionadas con el hipocampo se ven afectadas en el modelo de ratón SAMP8. Más aún, al aumentar el grado de dificultad de la prueba se ponen de manifiesto en estos ratones los déficits cognitivos de manera más temprana en la edad.

3.2.2. Otras alteraciones conductuales

- Ansiedad

Se ha demostrado que los ratones SAMP8 presentan una alteración emocional asociada a la edad caracterizada por una disminución del comportamiento ansioso (Miyamoto y col., 1992). Esto se pone de manifiesto en el test del laberinto elevado, en el que se observó un aumento de las entradas y del tiempo de permanencia en los brazos abiertos por parte de los ratones SAMP8 en comparación con la cepa SAMR1. Teniendo en cuenta que el sistema noradrenérgico está implicado en las alteraciones de la conducta relacionados con la respuesta al estrés, al miedo y a la ansiedad (Iida y col., 1985), muchos investigadores sugieren que el deterioro de este sistema de neurotransmisión podría participar en la disminución del comportamiento ansioso observado en el ratón SAMP8 (Miyamoto, 1997).

Es importante considerar esta alteración del comportamiento ansioso a la hora de interpretar los resultados obtenidos mediante las distintas pruebas de aprendizaje y memoria,

ya que, por un lado, la conducta puede verse afectada por un procesamiento ineficiente por parte de la amígdala (centro de las emociones) y, por otro, el miedo o la ansiedad pueden potenciar el procesamiento de la memoria en el hipocampo (revisado por Pallás y col., 2008).

- Ritmo circadiano

En relación al ritmo circadiano y a diferencia de lo observado en los ratones SAMR1, la actividad motora espontánea (AME) de los ratones SAMP8 de 4 meses de edad se encuentra aumentada, especialmente en las primeras 3-4 horas del periodo de luz. Este incremento diurno de la AME se observa también a los 8 meses de edad. Sin embargo, 4 meses después apenas se observan diferencias entre las dos cepas (Miyamoto, 1994; Miyamoto, 1997). Con respecto al consumo de agua de bebida, se ha observado que la ingesta durante el periodo nocturno tiende a disminuir en los ratones SAMP8 de 2 meses de edad, y que entre los 4 y los 12 meses de edad hay un aumento significativo en el consumo de agua diurno, comparado con ratones controles SAMR1 (Miyamoto, 1997; Nishiyama y col., 1994). Sin embargo, los ratones SAMR1 muestran en su AME y en el consumo de agua de bebida un ritmo circadiano común a la mayoría de otras cepas de ratón con mayor ingesta de agua en los periodos de oscuridad y menor en los periodos de luz.

3.3. Características neuropatológicas presentes en el ratón SAMP8

Numerosos estudios neuroquímicos y neurofarmacológicos han permitido lograr una buena caracterización de este modelo de ratón. Estas investigaciones comenzaron a realizarse por el equipo de investigación del Dr. Nomura alrededor del año 1986. Las alteraciones patológicas más destacadas en el cerebro de los ratones SAMP8 son: el estrés oxidativo, la fosforilación de tau, la patología amiloide y la neuroinflamación o gliosis.

3.3.1. Estrés oxidativo

La teoría de los **radicales libres** acerca del envejecimiento sostiene que las modificaciones oxidativas producidas por las especies reactivas de oxígeno (EROs) sobre las proteínas, el ADN, los lípidos de membrana y otras moléculas conducen a la disfunción celular y, en consecuencia, al envejecimiento del organismo tanto en los animales como en los humanos (Harman, 1956).

De acuerdo con esta hipótesis, un buen modelo de envejecimiento debería necesariamente mostrar un aumento del estrés oxidativo y, además, la modulación del mismo

debería conducir a una mejora significativa de los principales síntomas observados, así como de los déficits cognitivos. En este sentido, numerosos estudios han demostrado la existencia de estrés oxidativo en el cerebro del ratón SAMP8 (Poon y col., 2004; Pallás y col., 2008), como consecuencia de distintas alteraciones en algunas de las principales enzimas antioxidantes y otras enzimas implicadas en la producción de EROs, tal y como queda reflejado en la tabla 3. Es interesante destacar que algunas enzimas se encuentran significativamente alteradas sólo en machos, lo que podría explicar algunas de las discrepancias descritas sobre el ratón SAMP8 con respecto al estrés oxidativo (Sureda y col., 2006).

Tabla 3. Principales enzimas que se encuentran alteradas en el cerebro del ratón SAMP8.

Enzima	Alteración	Bibliografía
Superóxido dismutasa	↓ Actividad	Kurokawa y col., 2001
Glutation peroxidasa	↓ Actividad	Okatani y col., 2002
Oxido nítrico sintasa	↓ Actividad	Inada y col., 1996
Catalasa	↓ Actividad	Sato y col., 1996
AcyCoA oxidasa	↑ Actividad	Sato y col., 1996
Quinona oxidoreductasa	↑ Expresión	Kumar y col., 2000b

Paralelamente a los cambios de estas enzimas, un estudio realizado por Sato y col. (1996) mostró un aumento del contenido neto de EROs y de los niveles de peroxidación lipídica y de proteínas carbolínicas en la corteza cerebral de los ratones SAMP8 de entre 4 y 8 semanas de edad. Estos estudios sugieren que las alteraciones de las enzimas antioxidantes podrían ser la causa del aumento del estrés oxidativo a edades tempranas en la corteza de estos ratones, y demuestran que un mayor estado de oxidación precede a las manifestaciones de los déficits en el aprendizaje y de la memoria. Cabe destacar que la utilización de distintos tratamientos o estrategias para tratar de reducir el estrés oxidativo en el ratón SAMP8, como la restricción calórica (Choi y Kim, 2000), el té verde (Chan y col., 2006), la melatonina (Caballero y col., 2008; Cuesta y col., 2010) y la administración de

distintos antioxidantes, como ácido lipoico o N-acetilcisteína, han resultado en una mejora de la función cognitiva de estos ratones (Farr y col., 2003; Okatani y col., 2002).

3.3.2. Fosforilación de tau

La proteína tau forma parte de una familia de proteínas asociadas a los microtúbulos. Constituyen un grupo de seis isoformas implicadas en la estabilización de los microtúbulos, en el transporte a lo largo del axón y en la señalización que se realiza a través del citoesqueleto celular. Su funcionalidad viene regulada por su grado de fosforilación y, de hecho, una alteración del mismo se ha relacionado con numerosos desórdenes neurodegenerativos. En este sentido, su hiperfosforilación inhibe el ensamblaje de los microtúbulos provocando un colapso del sistema de transporte, un mal funcionamiento de la comunicación entre las células y, en consecuencia, la muerte neuronal (Brion, 2006; Cash y col., 2003; Iqbal y Grunde-Iqbal, 2006).

Por otro lado, la fosforilación de la proteína tau también aumenta su adherencia, lo que explica su tendencia a la agregación en forma de filamentos helicoidales pareados (FHP) cuando se encuentra en un estado hiperfosforilado. Estos FHP aparecen en numerosas enfermedades neurodegenerativas, como en la EA, y suelen encontrarse intraneuronalmente, enlazados helicoidalmente formando los ovillos neurofibrilares (ONFs) o alrededor de las placas de amiloide (Ihara, 2006) (Figura 2).

En el cerebro humano, se ha demostrado que estas alteraciones de la proteína tau están fuertemente vinculadas al proceso de envejecimiento. En el envejecimiento “normal o fisiológico”, los ONFs son escasos y se localizan fundamentalmente a nivel de sistema límbico. Sin embargo, en el envejecimiento llamado “patológico”, el número de ovillos aumenta considerablemente y el patrón de localización se expande hacia la zona temporal media en dirección a la corteza temporal, y de ahí al resto de la corteza, dando lugar a una arquitectura neurofibrilar desorganizada (DeKosky, 2002). Por ello, la relación entre la hiperfosforilación de tau con la edad y con la degeneración neuronal, paralelamente al hecho de ser el primer patrón de degeneración observado en la EA, hacen que este marcador sea importante a la hora de encontrar un modelo animal válido de envejecimiento o de EA.

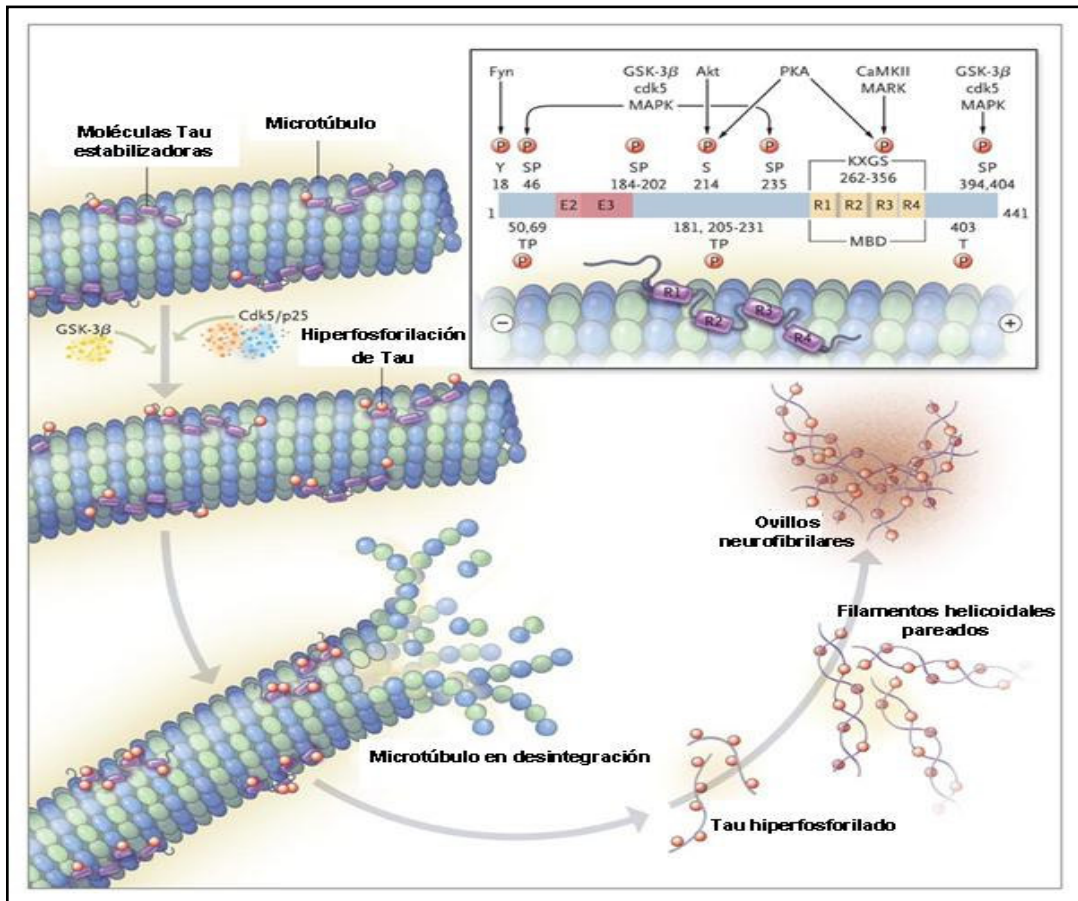


Figura 2. Alteración de los microtúbulos derivada de la fosforilación de la proteína tau. Cuando tau se hiperfosforila, los microtúbulos se desintegran colapsando el sistema de transporte de la neurona. La hiperfosforilación aumenta su adherencia, lo que explica su tendencia a agregarse en forma de filamentos helicoidales pareados, que son capaces de enlazarse helicoidalmente formando los ONFs. La fosforilación puede ocurrir en aproximadamente 79 residuos de serina/treonina por dos tipos diferentes de cinasas: las dirigidas a prolina, (GSK-3β, Cdk5, p38 y JNK) y las no dirigidas a prolina (MARK, CaMKII, PKA y PKC). (Adaptado de Querfurth y LaFerla, 2010).

El estado de fosforilación de la proteína tau depende del equilibrio entre la actividad de diversas cinasas y fosfatasas. Esta proteína puede ser fosforilada, aproximadamente, en 79 residuos (Goedert y col., 1989). Hasta la fecha, se han identificado una serie de serina/treonina cinasas que podrían ser las responsables de su fosforilación, entre las que se incluyen la cinasa glicógeno sintasa (GSK-3β), la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) y las proteínas cinasas activadas por estrés, entre las que se destaca la c-Jun-N-terminal cinasa (JNK) (Avila, 2004; Ferrer y col., 2005; Iqbal y col., 2005).

La implicación de la cinasa **GSK-3β** en procesos patológicos es tal, que su sobreexpresión provoca un daño importante en la capacidad de aprendizaje y en la memoria (Hernández y col., 2002; Hooper y col., 2007; 2008), una hiperfosforilación de tau (Cho y Johnson, 2003; 2004; Hanger y col., 1992; Lovestone y col., 1994), una exacerbación de la

respuesta inflamatoria inducida por la microglía alrededor de las placas de amiloide (Rodionova y col., 2007) y la inducción de procesos proapoptóticos que conducen a la pérdida neuronal (Baki y col., 2003; Turenne y Price, 2001). Teniendo estas consideraciones en cuenta, se ha propuesto a la GSK-3 β como una diana fundamental a la hora de abordar el estudio de las enfermedades que presenten hiperfosforilación de la proteína tau, también llamadas taupatías.

La fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) es una proteína implicada en vías de señalización cruciales para la supervivencia celular en un elevado número de tipos celulares, entre ellos las neuronas (Brunet y col., 2001). Tras la activación de los correspondientes receptores, en respuesta a algunas sustancias como determinadas citoquinas o factores de crecimiento se activa la PI3K. Esto lleva a un reclutamiento de la PI3K hacia la membrana y a la producción de fosfatidil-inositol-3-fosfato (PI3P), que se une a la proteína Akt, produciendo su fosforilación (p-Akt) y, en consecuencia, su activación. La p-Akt fosforila a la GSK-3 β en el residuo serina 9, provocando su inactivación (Yang y col., 2004). Es esta inactivación de la GSK-3 β la que evita la fosforilación de tau mediada por esta cinasa (Figura 3).

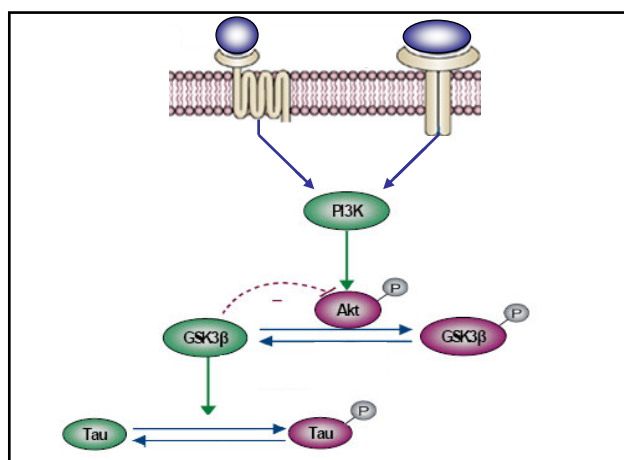


Figura 3. Vía de señalización PI3K/p-Akt/p-GSK-3 β . La PI3K tras su activación a través de los correspondientes receptores, en respuesta a algunas sustancias como determinadas citoquinas o factores de crecimiento, se une a la proteína Akt promoviendo su fosforilación (p-Akt) y activación. La p-Akt activa es capaz de fosforilar la GSK-3 β en el residuo Ser9 provocando su inactivación. La inactivación de la GSK-3 β evitaría la fosforilación de tau mediada por esta cinasa. (Adaptado de Schloesser y col., 2008).

La **Cdk5** es una cinasa clave para la regulación del ciclo celular. Su actividad se regula a través de la asociación con sus activadores específicos, p35 y p39 (Dhavan y Tsai, 2001). Sin embargo, varias investigaciones sugieren que la activación anómala de Cdk5 también juega un papel importante en la patogénesis de algunas enfermedades

neurodegenerativas, como la EA (Ahlijanian y col., 2000). En determinadas condiciones patológicas se produce un aumento de la concentración de calcio intracelular y, en consecuencia, la activación de determinadas proteínas dependientes del mismo entre las que se encuentra la proteasa calpaína. Una vez activada, la calpaína produce la proteólisis de p35, dando lugar a una molécula más estable, p25, que se une a Cdk5 provocando su activación (Patrick y col., 1999). El complejo Cdk5/p25 es responsable de inducir la fosforilación de un número elevado de proteínas citosólicas, principalmente tau (Kusakawa y col., 2000; Lee y col., 2000) (Figura 4).

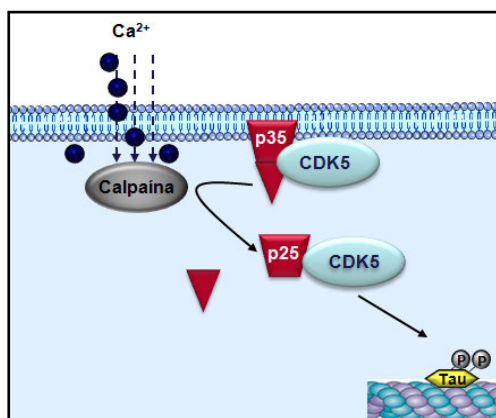


Figura 4. Vía de señalización Cdk5/p25. Distintos factores neurotóxicos, como el estrés oxidativo hacen que en las neuronas se active la calpaína, que corta p35 en p25 permitiendo el acceso de Cdk5 a otros sustratos. Además p25, más estable que p35, provoca la hiperactivación de Cdk5 con la consecuente hiperfosforilación de la proteína tau, alteración de la estructura del citoesqueleto y muerte neuronal. (Adaptado de Dhavan y Tsai, 2001).

Estudios recientes llevados a cabo en el ratón SAMP8, han proporcionado un conocimiento más profundo acerca del proceso de fosforilación de tau en el envejecimiento. De hecho, Canudas y col. (2005) han demostrado una hiperfosforilación de la proteína tau en los residuos Ser396, Ser404 y Thr231, en la corteza, hipocampo y estriado de los SAMP8 a los 5 meses de edad. Estos cambios iban acompañados por un aumento de la actividad Cdk5/p25 y de la expresión de Cdk5, mientras que no se observaron cambios en la actividad de la GSK-3 β . Sin embargo, en otro estudio posterior realizado por Tajés y col. (2010), se demostró una mayor activación de GSK-3 β (p-GSK-3 β en el residuo Tyr216) en ratones SAMP8 de 3 meses de edad, al compararlos con ratones SAMR1. Es importante tener en cuenta que la administración de melatonina (Gutiérrez-Cuesta y col., 2007) o cloruro de litio redujeron tanto la activación de GSK-3 β como la de la vía Cdk5/p35/p25, produciendo una

reducción de los niveles de p-tau. Estos estudios sugieren que ambas vías juegan un papel importante en la hiperfosforilación de tau en el ratón SAMP8.

Otra proteína que parece ser crucial en la fosforilación de tau es **JNK**, cinasa que se activa por distintas formas de estrés celular y ambiental (Borsello y Forloni, 2007; Davis, 2000; Ploia y col., 2011; Yoshida y col., 2004). Además, se ha propuesto a la forma fosforilada de JNK (p-JNK) como un indicador de procesos neurodegenerativos (Tajes y col., 2010). Al hilo de esta hipótesis, se ha asociado la aparición de algunas enfermedades neurodegenerativas, como la EA, con niveles elevados de determinadas citoquinas inflamatorias, gliosis y EROs (Mc Geer y Mc Geer, 1995), que pueden ser, al menos en parte, responsables de la activación de dicha cinasa y por lo tanto de la hiperfosforilación de tau en el transcurso de la enfermedad.

Una de las principales proteínas responsables de la activación y de la fosforilación de JNK es la cinasa cinasa activada por mitógenos 4 (MAPKK4), cuya sobreexpresión se ha asociado con el desarrollo de la EA y otros procesos neurodegenerativos (Butterfield y Poon, 2005). En este sentido, un estudio previo ha descrito un aumento de los niveles de ARNm de la proteína MAPKK4 en el hipocampo de los ratones SAMP8 (Kumar y col., 2000b). Además, recientemente se ha demostrado que los ratones SAMP8, en comparación con los SAMR1, presentan un aumento en la fosforilación de JNK (p-JNK) que es significativa desde los 3 meses de edad (Tajes y col., 2010). Sin embargo, el grado de implicación de JNK en la hiperfosforilación de tau que presentan estos animales no ha sido aún del todo esclarecido.

Por otro lado, Álvarez-García y col. (2006) encontraron niveles elevados de **α -sinucleína** en el cerebro del ratón SAMP8. Esta proteína juega un papel importante en algunos trastornos neurodegenerativos como potente inductor de la hiperfosforilación de tau, por lo que su sobreexpresión en este modelo animal podría explicar también, al menos en parte, la patología tau que presentan estos ratones.

3.3.3. La patología amiloide

El **A β** es producido por el corte de la proteína precursora del amiloide (APP). La **APP** es una proteína transmembrana ubicua cuya función no está del todo bien establecida, aunque parece jugar un papel importante en el mantenimiento de la estructura axonal. Posee una porción intracelular pequeña que contiene el extremo carboxilo terminal, una región transmembrana y una porción extracelular relativamente larga (Figueiredo-Pereira y col.,

1999) (Figura 5). El procesamiento de la APP puede ocurrir en todas sus localizaciones (membrana plasmática, aparato de Golgi, retículo endoplasmático o en las membranas de los endosomas, lisosomas o mitocondrias), liberándose el péptido A β directamente al espacio extracelular o al intracelular. Este procesamiento puede seguir dos vías metabólicas distintas (Figura 6).

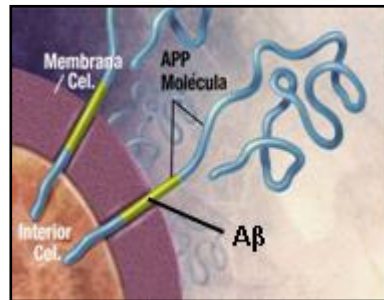


Figura 5. Estructura de la APP (adaptado de www.nia.nih.gov). Cel: célula; APP: proteína precursora del amiloide; A β : péptido β -amiloide.

- **Procesamiento no amiloidogénico:** En condiciones normales, se produce principalmente el procesamiento no amiloidogénico de la APP, donde la enzima **α -secretasa** corta la porción intermedia correspondiente a la región del péptido A β , concretamente en la Lys16, dando origen a una proteína larga que se compone de prácticamente toda la región extracelular de la APP y que es excretada al medio extracelular nada más ser cortada (α APPs), y a un péptido de 83 aminoácidos denominado C83 (Yamazaki y col., 1996). Este último es procesado posteriormente por acción de la **γ -secretasa**, produciendo un péptido conocido como p3, y el fragmento C-terminal de la proteína precursora del amiloide (AICD, *amyloid precursor protein intracellular domain*) (Lammich y col., 1999). Se ha descrito que tanto el fragmento α APPs como el C83 poseen efectos beneficiosos en cultivos neuronales que se asocian a la supervivencia celular, interacción célula-matriz intersticial, crecimiento neurítico, formación sináptica y plasticidad neuronal (Jin y col., 1994; Meziane y col., 1998; Pérez y col., 1997; Shivers y col., 1988).

- **Procesamiento amiloidogénico:** En el metabolismo amiloidogénico, la **β -secretasa** realiza un corte en el extremo amino terminal de la región del péptido A β (Sinha y col., 1999; Vassar y col., 1999; Yang y col., 1999), generando dos fragmentos: uno distal, que segrega al medio extracelular, conocido como β APPs, y un péptido de 99 aminoácidos unido a la membrana, denominado C99, que contiene todo el péptido A β y el extremo carboxilo de

la APP. Este fragmento es internalizado rápidamente hasta el compartimento lisosomal, donde sufre una nueva digestión proteolítica por la γ -secretasa, generándose un péptido de 55-57 aminoácidos (AICD) y el péptido A β (Figueiredo-Pereira y col., 1999), que puede variar entre 38 y 43 aminoácidos (Selkoe, 2001a; 2001b; Younkin, 1998). En humanos, la especie mayoritaria de A β es aquella que contiene 40 aminoácidos (A β_{40}) pero, aunque de manera minoritaria (10-15%), la γ -secretasa produce también péptidos de 42 aminoácidos (A β_{42}). En cambio, en determinadas líneas de modelos animales de EA, la forma que se produce mayoritariamente es la de 42 aminoácidos (Sabbagh y col., 2008). Se ha descrito que la relación entre la forma de 42 aminoácidos y la de 40 puede ser también importante en la etiología de la enfermedad (Mayeux, 2003; Wiltfang y col., 2007).

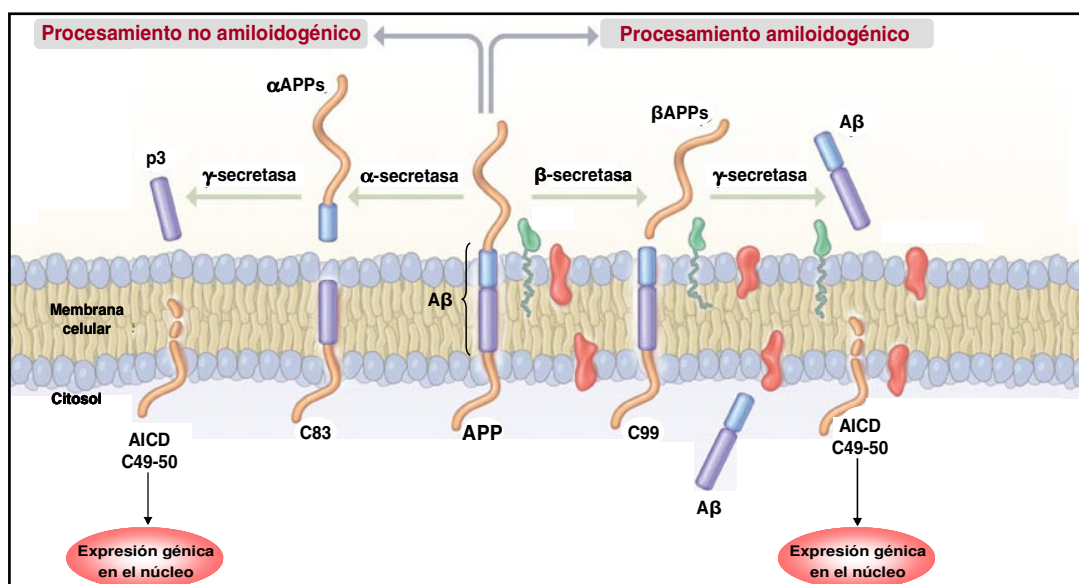


Figura 6. Procesamiento de la APP. Procesamiento no amiloideogénico: la enzima α -secretasa corta la porción intermedia de la región del péptido A β , dando origen a una proteína larga que es excretada al medio extracelular (α APPs), y un péptido de 83 aminoácidos (C83). Este es procesado por la γ -secretasa produciendo el péptido p3 y el fragmento C-terminal del APP (AICD). Procesamiento amiloideogénico: La β -secretasa realiza un corte en el extremo amino terminal de la región del péptido A β , generando un fragmento distal (β APPs), y un péptido de 99 aminoácidos (C99). Este fragmento sufre un nuevo corte por la γ -secretasa, generándose el AICD y el péptido A β . (Adaptado de Querfurth y LaFerla, 2010).

Pese a que no existe uniformidad de criterios sobre la importancia de los fragmentos derivados de la APP en la patología de la EA, la **hipótesis de la cascada amiloide** postula que en la EA se produce un desequilibrio inicial entre la producción y el aclaramiento del péptido A β que conduce a una acumulación de éste a nivel cerebral (Selkoe, 1997; Sheng y Kim, 2002). Esta acumulación desencadenaría fenómenos como la formación de ONFs,

excitotoxicidad glutamatergica, estrés oxidativo, inflamación y activación de la apoptosis celular (Hardy y Selkoe, 2002) (Figura 7).

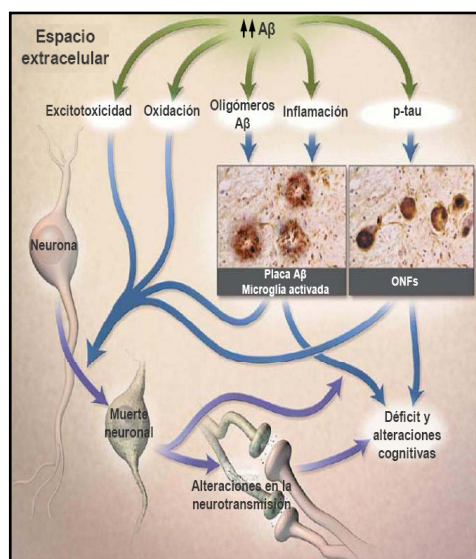


Figura 7. Hipótesis de la cascada amiloide. El acúmulo de A β a nivel cerebral, desencadena la formación de ONFs, inflamación, excitotoxicidad glutamatergica, estrés oxidativo y activación de la apoptosis celular. (Adaptada de Cummings, 2004).

Esta hipótesis se sustenta en el componente genético de la EA, puesto que se ha demostrado que las mutaciones que presentan los pacientes que padecen la **EAF**, ya sea a nivel de la APP o de las presenilinas (proteínas que forman parte del complejo γ -secretasa), conducen a una mayor producción del péptido A β_{42} . A este respecto, es importante señalar que la mayoría de los pacientes de EA se encuadran dentro de la EAE, que no se encuentra asociada a mutaciones genéticas (Blennow y col., 2006; Turner, 2006) y sólo una pequeña proporción de pacientes poseen alguna de las formas familiares de la EA. En cualquier caso, el A β acumulado sufriría un cambio de conformación que facilitarían su agregación en oligómeros solubles y, posteriormente, en fibras insolubles que se depositarían en forma de placas.

La β -secretasa es la enzima limitante en la producción de A β , por esto constituye una diana importante para el desarrollo de posibles fármacos para el tratamiento de la EA. Hay distintas β -secretasas que juegan un papel crucial en la producción de A β . Hasta hace relativamente poco tiempo se afirmaba que **BACE1** era la β -secretasa principal responsable del procesamiento de la APP. Recientemente se ha demostrado que hay otra β -secretasa, la **Catepsina B**, que presenta una mayor eficiencia en el procesamiento de la APP no mutada

para el sitio de la β -secretasa (Hook y col., 2005). Paralelamente, se ha descrito que BACE1 metaboliza mejor la APP con la mutación sueca (Schechter y Ziv, 2008). Puesto que, como se ha mencionado anteriormente, la mayor parte de los casos de EA no responden a una causa genética, Catepsina B se plantea como una nueva diana terapéutica en el tratamiento de la EA (Hook y col., 2008).

Algunos estudios indican que un procesamiento anormal de la APP podría contribuir al aumento del estrés oxidativo y al déficit cognitivo observados en el ratón SAMP8 envejecido (Butterfield y Poon, 2005). En este sentido, un estudio reciente llevado a cabo por Zhou y col. (2012), ha demostrado que la actividad de la β -secretasa en el hipocampo de los ratones SAMP8 es mayor que la encontrada en los SAMR1, sugiriendo que este aumento de la actividad β -secretasa, asociado a la edad, podría ser el responsable de la producción y acumulación de $A\beta$ en el cerebro del ratón SAMP8. Además, observaron que la expresión del ARNm de BACE1 en el hipocampo de los ratones SAMP8 de 12 meses de edad y la expresión del ARNm de la Catepsina B en la corteza cerebral de estos ratones de 2 y 6 meses de edad era significativamente mayor que la de los ratones SAMR1 de la misma edad.

Asimismo, investigaciones realizadas en el ratón SAMP8 sobre la molécula de APP han descrito que, a nivel de aminoácidos, la homología observada con otras secuencias de APP pertenecientes a otros ratones fue de 99.2%. Se observó además que la APP del ratón SAMP8 no presentaba mutaciones relacionadas con la EAF (Kumar y col., 2001) pero que, sin embargo, su expresión va aumentando proporcionalmente con la edad (Kumar y col., 2000b), lo que se ha asociado con un aumento de la gliosis, con un incremento de GFAP (Nomura y col., 1996) y con el deterioro del aprendizaje y de la memoria observado en el ratón SAMP8 (Morley y col., 2000). De hecho, estudios en los que se administró intracerebroventricularmente un oligonucleótido antisentido frente a la región $A\beta$ del gen de la APP en los ratones SAMP8 demostraron una reducción en el nivel de APP en distintas regiones cerebrales (entre las que se incluye el hipocampo), una disminución de la peroxidación lipídica y de la oxidación proteica, y una mejora significativa en el déficit del aprendizaje y de la memoria (Kumar y col., 2000a; Poon y col., 2004).

Respecto al péptido $A\beta$, algunos estudios mostraron un aumento del mismo asociado a la edad en el ratón SAMP8 que se relacionó con el déficit cognitivo observado en los ratones. Este péptido se localiza en regiones que se encuentran afectadas en la EA, incluido el hipocampo (Fukunari y col., 1994; Takemura y col., 1993). Además, investigaciones más

recientes han descubierto que tras la administración por vía intracerebroventricular (Morley y col., 2002) o por vía intravenosa (Banks y col., 2007) de anticuerpos anti-A β se produce una reducción de los depósitos de A β y se consigue revertir los déficits del aprendizaje y de la memoria observados en el ratón SAMP8.

Adicionalmente, un artículo reciente de Del Valle y col. (2010) ha demostrado por primera vez que desde los 6 meses de edad, los ratones SAMP8 ya presentan depósitos de A β en el hipocampo, que van aumentando con la edad tanto en número como en extensión. Este estudio sugiere que el ratón SAMP8 podría ser una herramienta útil para entender los mecanismos implicados en los depósitos de A β en el envejecimiento. Sin embargo, la presencia de placas de A β en el hipocampo de los ratones SAMP8 no se ha detectado hasta los 18 meses de edad (revisado por Pallás y col., 2008).

Por otro lado, otros marcadores relacionados con el péptido A β y con la EA, como la apolipoproteína E (ApoE; Wei y col., 1999) y la Presenilina 1 (PS1), también se encuentran alterados en este modelo de ratón (Kumar y col., 2009). Con respecto a la ApoE, se ha descrito una reducción en la expresión del ARNm de esta proteína en el hipocampo del ratón SAMP8 que podría afectar a la plasticidad neuronal y a la producción de A β , así como contribuir al deterioro del aprendizaje y de la memoria. De la PS1 cabe destacar que, junto con otras proteínas, forma parte del complejo que constituye la γ -secretasa. Los resultados obtenidos por Kumar y col. (2009) muestran que la secuencia de ADNc de la PS1 es idéntica a la de otros tipos de ratón, aunque se observa un incremento en la expresión de la PS1 en el hipocampo de los ratones SAMP8 que puede alterar el balance estequiométrico del complejo γ -secretasa, favoreciéndose el procesamiento amiloidogénico de la APP.

3.3.4. Gliosis

La patología glial descrita en el cerebro envejecido es otro factor importante que contribuye a la neurodegeneración asociada a la edad (Sastre y col., 2006). La activación rápida de los astrocitos que tiene lugar en eventos patogénicos conduce a un aumento en la síntesis de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). De hecho, son numerosos los estudios que demuestran un aumento de los niveles de expresión de GFAP y una hipertrofia de los astrocitos en cerebros de pacientes de EA (Beach y Mc Geer, 1988; Kashon y col., 2004).

En este sentido, varios estudios han demostrado que el ratón SAMP8 presenta una similar, aunque no idéntica, expresión de estos marcadores. De hecho, mediante la técnica

de fijación de radioligandos o “binding” se demostró un aumento de la gliosis asociado a la edad en la corteza cerebral y en el hipocampo de ratones SAMP8, así como un aumento de la inmunoreactividad de GFAP (Nomura y col., 1996). Investigaciones más recientes han confirmado estos resultados demostrando una marcada astrogliosis y microgliosis en la corteza cerebral de ratones SAMP8 de 5 meses de edad, en comparación con sus respectivos ratones control SAMR1 (Sureda y col., 2006).

Estudios similares realizados mediante técnicas de inmunohistoquímica, western blot y RT-PCR han demostrado un aumento significativo de GFAP, tanto a nivel de la proteína como del ARNm, en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos, en comparación con ratones de la misma edad pertenecientes a la cepa SAMR1 (Wu y col., 2005).

3.3.5. Otras alteraciones neuropatológicas

Otras características bioquímicas que presenta el ratón SAMP8 y que podrían estar participando en su déficit cognitivo son alteraciones en los **sistemas de neurotransmisión** glutamatérgica, colinérgica y noradrenérgica (Nomura y Okuma, 1999). Se ha descrito un aumento en los niveles de algunos neurotransmisores, como glutamato, aspartato, y GABA en los ratones SAMP8 a los 10 meses de edad, en comparación con ratones de la misma edad pertenecientes a la cepa control SAMR1, lo que podría indicar un deterioro de las terminales nerviosas en los ratones SAMP8 añosos (Kitamura y col., 1992). Además, es bien conocido que la acumulación local de aminoácidos excitatorios lleva consigo la aparición de efectos neurotóxicos. Por otro lado, estudios encaminados a analizar la actividad de receptores de distintos neurotransmisores han demostrado una disminución de la actividad de los receptores muscarínicos para acetilcolina en el hipocampo y un aumento de la actividad de los α -adrenoreceptores en la corteza frontal de los ratones SAMP8, en comparación con los ratones SAMR1 (Kitamura y col., 1989).

Por otro lado, se ha descrito que este ratón muestra una alteración de la permeabilidad de la **barrera hematoencefálica** (BHE) que podría ser la causa de la acumulación anómala de algunas proteínas en el cerebro del SAMP8 añoso (Ueno y col., 1993; 1996).

Paralelamente, otros estudios realizados pusieron de manifiesto la existencia de una serie de **alteraciones de genes asociados a la EA** en este modelo de ratón. Se ha encontrado una disminución de los niveles del ARNm de los receptores de glucocorticoides y

mineralocorticoides (GR- α y MR, respectivamente) en el hipocampo de los ratones SAMP8 en comparación con los ratones SAMR1 (Wei y col., 1999). En este mismo estudio se demostró que los SAMP8 presentaban un aumento de los niveles de ARNm de la proteína bcl-2 α , la presenilina 2 (PS2) y de la proteína tau. Estos resultados indicaron que algunos genes que se expresan de manera anómala en el cerebro de los pacientes de EA se encuentran también alterados en el ratón SAMP8, lo que podría contribuir al deterioro de los procesos de aprendizaje y de la memoria observado en este modelo de ratón.

Concluyendo, por todas las características aquí descritas, la cepa de ratón con tendencia al envejecimiento acelerado o ratón **SAMP8** parece ser un buen modelo murino de envejecimiento y deterioro cognitivo asociado a la edad. Además, puesto que desarrolla de manera espontánea una neurodegeneración que se asemeja a la **EA esporádica** (95% de los casos de la EA) ya que presenta la mayoría de los **marcadores histopatológicos** que la caracterizan, el ratón SAMP8 constituye también un modelo idóneo para el estudio de la etiología de esta enfermedad, así como para la identificación de nuevas dianas terapéuticas y el estudio y desarrollo de futuros tratamientos.

4. El sildenafil

Las **fosfodiesterasas** (PDEs) son enzimas encargadas de romper el enlace fosfodiéster de los nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc, segundos mensajeros que regulan muchos procesos biológicos, por lo que participan en diversas cascadas de señalización intracelular. En los mamíferos se han identificado 11 familias de PDEs. Algunas de ellas tienen alta especificidad para el GMPc (PDE5, PDE6, PDE9), otras frente al AMPc (PDE4, PDE7, PDE8) y otras presentan una especificidad mixta (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10, PDE11) (revisado por Puzzo y col., 2008). Las PDEs se encuentran distribuidas por todo el organismo, y la mayoría también se han localizado en el SNC (revisado por Bender y Beavo, 2006). En los últimos años se han llevado a cabo muchos estudios utilizando inhibidores de las PDEs como potenciales agentes terapéuticos. Estos inhibidores aumentan los niveles de los nucleótidos cíclicos a través del bloqueo de la función de la enzima PDE.

El **sildenafil** es un inhibidor de la PDE5 y fue el primer fármaco de administración oral aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de la disfunción eréctil (Viagra®). El descubrimiento de este fármaco (recogido inicialmente bajo el nombre UK-92480), por la compañía farmacéutica Pfizer fue el resultado de una extensa investigación

en agentes químicos potencialmente eficaces en el tratamiento de enfermedades coronarias. Los primeros ensayos clínicos desarrollados a principios de los 90 no fueron demasiado prometedores con respecto a su potencial antianginoso; sin embargo, se observó un marcado efecto secundario en un alto número de voluntarios que participaron en dichos ensayos; el sildenafil parecía facilitar las erecciones. Este efecto secundario pronto se convirtió en el principal objetivo de estudios posteriores. El compuesto fue patentado en 1996 y dos años más tarde, en 1998, fue aprobado por la FDA para su uso en el tratamiento de la disfunción eréctil. El descubrimiento de este nuevo fármaco reportó a su compañía durante los dos primeros años en el mercado más de mil millones de dólares y ya en el año 2005, más de 20 millones de hombres en todo el mundo fueron tratados con este fármaco, lo que da una idea aproximada del alcance y la trascendencia de dicho hallazgo fortuito (Kukreja y col., 2005). Tras la salida del sildenafil al mercado, otros dos compuestos de la misma familia fueron patentados por diversas compañías farmacéuticas: **vardenafilo** (Levitra®) de la compañía Bayer; y **tadalafilo** (Cialis®) patentado por Icos corporation y Eli Lilly. Aunque sus ventas descendieron debido a la competencia con estos dos fármacos, así a como sus propias falsificaciones y a la aparición de testimonios de pacientes que sufrían pérdidas de visión con su consumo, en el año 2008 sildenafil reportó a la compañía más de 1900 millones de dólares.

- Mecanismo de acción

Durante la estimulación sexual, el óxido nítrico (NO) es liberado en el cuerpo cavernoso del pene, lo que conlleva a una activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs). Esta activación enzimática produce un aumento de la concentración de guanosín monofosfato cíclico (GMPc), responsable de la relajación muscular, que facilita un aumento del flujo sanguíneo y la consecuente erección. El sildenafil tiene una estructura similar al GMPc (Figura 8), por lo que se une a lugares específicos de la PDE5 donde se produce la degradación de la molécula, provocando la inhibición de la enzima. Como consecuencia, se produce un aumento de los niveles de GMPc, facilitándose de esta forma la erección.

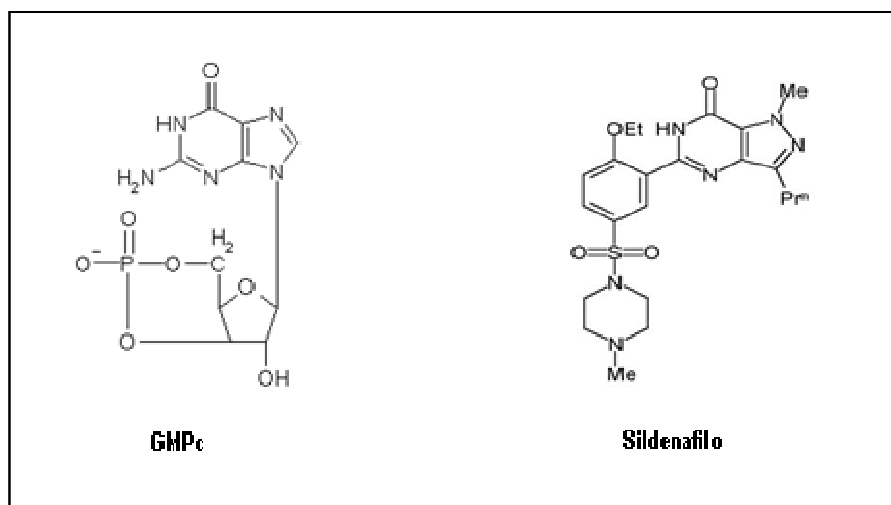


Figura 8. Estructura química del GMPc y del sildenafil.

La **PDE5** es una enzima que presenta especificidad por el GMPc. Los niveles tisulares de GMPc dependen del equilibrio entre la actividad de la GC, responsable de la formación de guanosín trifosfato (GTP) y de la PDE5 que cataliza el paso de GMPc a guanosín monofosfato (GMP). Se ha identificado la expresión de la PDE5 en diversas partes del cuerpo como los pulmones, las plaquetas, el músculo liso y varias regiones cerebrales (Bender y Beavo, 2004; Wang y col., 2005), entre las que se incluye el hipocampo, donde parece jugar un papel importante en procesos de memoria y de potenciación a largo plazo (Barad y col., 1998; Beavo, 1995). Por tanto el sildenafil, al inhibir la PDE5, produce un aumento en los niveles de GMPc no sólo en el cuerpo cavernoso, sino también en todas estas partes del organismo. Esto produce una serie de efectos en diversos órganos del cuerpo, derivados en su mayoría de la activación de la cinasa dependiente de GMPc (PKG), lo que ha llevado a muchos grupos de investigación a explorar las posibles nuevas aplicaciones de este inhibidor de la PDE5. De hecho, en junio del 2005 la FDA aprobó la prescripción de sildenafil para una nueva indicación: el tratamiento de la hipertensión pulmonar. Este nuevo registro se hizo en base a los estudios que demostraban su eficacia en esta patología (Guazzi y col., 2004), comercializándose bajo el nombre de Revatio® (Pfizer) (Kane y Klings, 2006; Reichenberger y col., 2006). Asimismo, estudios recientes indican que el sildenafil, además de presentar muy buena tolerancia y seguridad en el tratamiento de la disfunción eréctil e hipertensión pulmonar, podría ofrecer nuevas oportunidades terapéuticas en el tratamiento de enfermedades muy diversas, como son el deterioro cognitivo asociado a

la edad, el dolor, la esclerosis múltiple y el infarto cerebral (Uthayathas y col., 2007) (Figura 9).

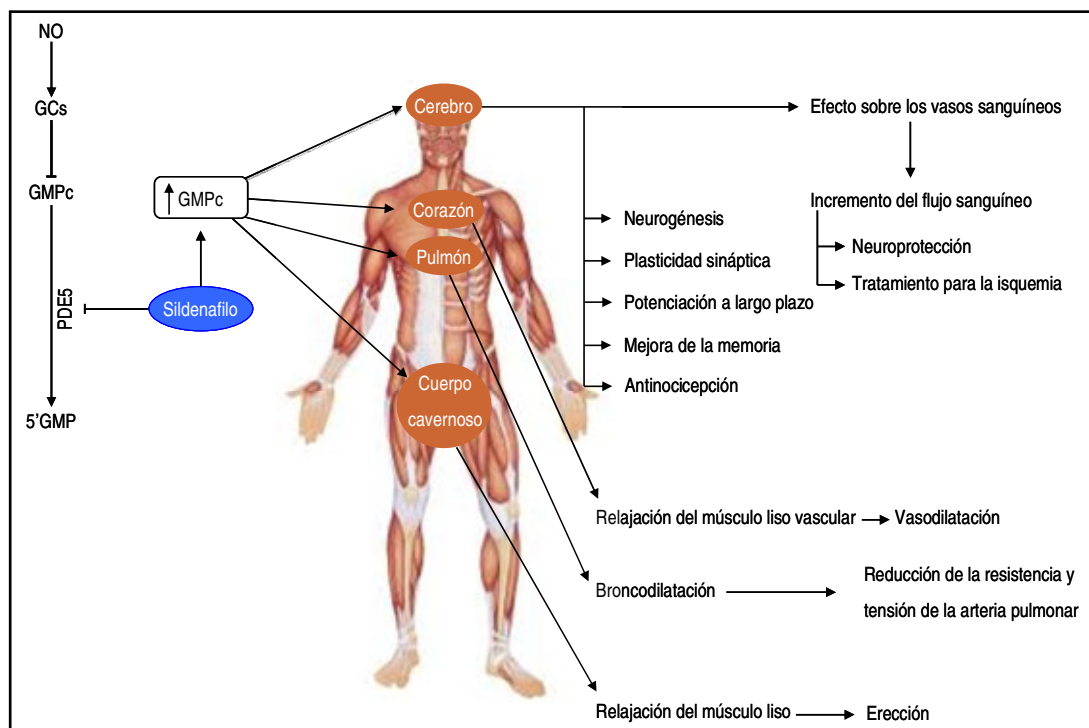


Figura 9. Efecto del incremento de los niveles de GMPc sobre diversas funciones del organismo. (Adaptada de Uthayathas y col., 2007).

- Sildenafil y neuroprotección

En los últimos 10 años, numerosas investigaciones han centrado sus esfuerzos en valorar el potencial terapéutico del sildenafil a nivel de SNC.

En este sentido, algunos estudios han demostrado que el sildenafil podría potenciar la **neurogénesis** a través de un aumento de los niveles de GMPc. El NO influye en el proceso de neurogénesis y en el desarrollo del cerebro en la etapa prenatal a través del GMPc (Chen y col., 2004). De hecho, el crecimiento neuronal y los niveles de GMPc disminuyen de forma paralela con la edad (Taddei y col., 2001). Estudios en los que se ha administrado sildenafil en cultivos celulares han demostrado que este fármaco aumenta los niveles de GMPc y favorece la neurogénesis en estas células (Wang y col., 2005). Este mismo efecto también se ha observado en estudios animales, donde el tratamiento con sildenafil fue capaz de favorecer la recuperación funcional y la neurogénesis después de una **isquemia cerebral** en la rata (Zhang y col; 2002; 2006).

Por otro lado, estudios recientes de nuestro equipo de investigación han demostrado que el sildenafil revierte los déficits serotoninérgicos producidos por el derivado amfetamínico: 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) (Puerta y col., 2009) y disminuye de forma significativa la pérdida neuronal producida por la toxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico en rata (Puerta y col., 2010).

En relación con otras enfermedades del SNC, algunos estudios han resaltado que el sildenafil mejora los síntomas clínicos en un modelo animal de **esclerosis múltiple** (Pifarré y col., 2011). Esta neuroprotección observada podría resultar de la prevención de la pérdida axonal, de la disminución de la activación de la microglía, y del fenómeno de remielinación producida por el sildenafil. Cabe destacar también que se ha descrito un aumento de la actividad **antidepresiva** de la amitriptilina al administrarla en combinación con sildenafil en el ratón (Socala y col., 2012).

- *Sildenafil y memoria*

En los últimos años, varios trabajos han demostrado que los inhibidores de la PDE5 pueden contrarrestar los déficits en la memoria a largo plazo causados por agentes farmacológicos o por el envejecimiento fisiológico en la rata (Devan y col., 2004; 2006; Erceg y col., 2005; 2006). En línea con estos estudios, se ha demostrado que la inhibición de la PDE5 contrarresta el deterioro del aprendizaje espacial inducido por la inhibición de la NOS (Devan y col., 2005; 2006) y por el bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos producido por escopolamina en la rata (Devan y col., 2004).

En otros trabajos de investigación se ha observado que el sildenafil juega un papel importante en el proceso de retención a largo plazo en el ratón mediante la modulación de mecanismos implicados en almacenamiento de la memoria (Baratti y Boccia, 1999). Adicionalmente, un estudio posterior demostró que esta mejora de la memoria es dosis-dependiente (Singh y Parle, 2003). Además, la inhibición de la PDE5 mejora la memoria sobre el reconocimiento del objeto (Prickaerts y col., 2002; 2004; Rutten y col., 2005), y la administración directa del sildenafil en el hipocampo produce una mejora significativa en la memoria de los ratones sometidos al test de reconocimiento de objeto (Monfort y col., 2004; Rutten y col., 2005).

Recientemente, dos estudios han demostrado que el sildenafil es capaz de mejorar el déficit cognitivo descrito en dos modelos de ratón transgénicos de EA. En el primer trabajo,

Puzzo y col. (2009) asocian esta mejora cognitiva en el ratón doble transgénico **APP/PS1** a una reducción de los niveles del péptido A β . En el segundo estudio, sin embargo, en ratones **Tg 2576** de 16 meses de edad la reversión de los déficits cognitivos va acompañada de una mejora significativa de la patología tau pero no del péptido A β (Cuadrado-Tejedor y col., 2011). Estos y otros estudios sugieren el potencial de los inhibidores de la PDE5 como fármacos neuroprotectores, así como su eficacia en el tratamiento de diversas alteraciones del SNC.

Bibliografía

- Ahlijanian** MK, Barrezueta NX, Williams RD, Jakowski A, Kowsz KP, McCarthy S, Coskran T, Carlo A, Seymour PA, Burkhardt JE, Nelson RB, McNeish JD (2000) Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2910-2915.
- Alvarez-García** O, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, Tomás-Zapico C, Camins A, García JJ, Pallàs M, Coto-Montes A (2006) Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age. *Biogerontology* **7**, 43-52.
- Avila** J (2004) The influence of aging in one tauopathy: Alzheimer's disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **52**, 410-413.
- Baki** L, Shioi J, Wen P, Shao Z, Schwarzman A, Gama-Sosa M, Neve R, Robakis NK (2003) PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *EMBO J* **23**, 2586-2596.
- Banks** WA, Farr SA, Morley JE, Wolf KM, Geylis V, Steinitz M (2007) Anti-amyloid beta protein antibody passage across the blood-brain barrier in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease: an age-related selective uptake with reversal of learning impairment. *Exp Neurol* **206**, 248-256.
- Barad** M, Bourtchouladze R, Winder DG, Golan H, Kandel E (1998) Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 15020-15025.
- Baratti** CM, Boccia MM (1999) Effects of sildenafil on longterm retention of an inhibitory avoidance response in mice. *Behav Pharmacol* **10**, 731-737.
- Beach** TG, McGeer EG (1988) Lamina-specific arrangement of astrocytic gliosis and senile plaques in Alzheimer's disease visual cortex. *Brain Res* **463**, 357-361.
- Beavo** JA (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* **75**, 725-748.

- Bender AT, Beavo JA (2004)** Specific localized expression of cGMP PDEs in Purkinje neurons and macrophages. *Neurochem Int* **45**, 853-857.
- Bender AT, Beavo JA (2006)** Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* **58**, 488-520.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006)** Alzheimer's disease. *Lancet* **368**, 387-403.
- Borsello T, Forloni G (2007)** JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration. *Curr Pharmaceut Design* **13**, 1875-1886.
- Brion JP (2006)** Immunological demonstration of tau protein in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **9**, 177-185.
- Brody DL, Holtzman DM (2006)** Morris water maze search strategy analysis in PDAPP mice before and after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* **197**, 330-340.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001)** Transcription-dependent and independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 297-305.
- Butterfield DA, Poon HF (2005)** The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* **40**, 774-783.
- Caballero BI, Vega-Naredo V, Sierra C, Huidobro-Fernandez C, Soria-Valles DD, Gonzalo-Calvo D Tolivia, Gutierrez-Cuesta J, Pallas M, Camins A, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A (2008)** Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* **45** 302-311.
- Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodriguez MI, Acuna-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallas M (2005)** Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* **126**, 1300-1304.
- Cash AD, Aliev G, Siedlak SL, Nunomura A, Fujioka H, Zhu X, Raina AK, Vinters HV, Tabaton M, Johnson AB, Paula-Barbosa M, Avila J, Jones PK, Castellani RJ, Smith MA, Perry G (2003)** Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. *Am J Pathol* **162**, 1623-1627.

- Chen** YC, Hosoda K, Tsai CJ, Yamamoto S, Wang MF (2006) Favorable effects of tea on reducing the cognitive deficits and brain morphological changes in senescence-accelerated mice. *J Nutr Sci Vitaminol* **52**, 266-273.
- Chen** GH, Wang YJ, Wang XM, Zhou JN (2004) Accelerated senescence prone mouse-8 shows early onset of deficits in spatial learning and memory in the radial six-arm water maze. *Physiol Behav* **82**, 883-890.
- Chen** J, Tu Y, Moon C, Matarazzo V, Palmer AM, Ronnett GV (2004) The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance. *Dev Biol* **269**, 165-182.
- Cheng** H, Yu J, Jiang Z, Zhang X, Liu C, Peng Y, Chen F, Qu Y, Jia Y, Tian Q, Xiao C, Chu Q, Nie K, Kan B, Hu X, Han J (2008) Acupuncture improves cognitive deficits and regulates the brain cell proliferation of SAMP8 mice. *Neurosci Lett* **432**, 111-116.
- Cho** JH, Johnson GV (2003) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem* **278**, 187-193.
- Cho** JH, Johnson GV (2004) Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *J Neurochem* **88**, 349-358.
- Choi** JH, Kim D (2000) Effects of age and dietary restriction on lifespan and oxidative stress of SAMP8 mice with learning and memory impairments. *J Nutr Health Aging* **4**, 182-186.
- Cotran** RS, Kumar V, Robbins SL (1989) Diseases of aging. In: *Robbins pathologic basis of disease*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp 543-551.
- Cuadrado-Tejedor** M, Hervias I, Ricobaraza A, Puerta E, Pérez-Roldán JM, García-Barroso C, Franco R, Aguirre N, García-Osta A (2011) Sildenafil restores cognitive function without affecting β -amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* **64**, 2029-2041.
- Cuesta** S, Kireev R, Forman K, Garcia C, Escames G, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA (2010) Melatonin improves inflammation processes in liver of senescence-accelerated prone male mice (SAMP8) *Exp Gerontol* **45**, 950-956.

Cummings JL (2004) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **351**, 56-67.

Davis R J (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-252.

DeKosky St (2002) Neurobiología y biología molecular de la Enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* **35**, 752-60.

Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Casadesús G, Smith MA, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J (2010) Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis* **19**, 1303-1315.

Devan BD, Bowker JL, Duffy KB, Bharati IS, Jimenez M, Sierra-Mercado D Jr, Nelson CM, Spangler EL, Ingram DK (2006) Phosphodiesterase inhibition by sildenafil citrate attenuates a maze learning impairment in rats induced by nitric oxide synthase inhibition. *Psychopharmacology* **183**, 439-445.

Devan BD, Duffy KB, Bowker JL, Bharati IS, Nelson CM, Daffin Jr LW, Spangler EL, Ingram DK (2005) Phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibition and cognitive enhancement. *Drugs of the Future* **30**, 725-736.

Devan BD, Sierra-Mercado D Jr, Jimenez M, Bowker JL, Duffy KB, Spangler EL, Ingram DK (2004) Phosphodiesterase inhibition by sildenafil citrate attenuates the learning impairment induced by blockade of cholinergic muscarinic receptors in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **79**, 691-699.

Dhavan R, Tsai L-H (2001) A decade of CDK5. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 749-759.

Driscoll I, Sutherland RJ (2005) The aging hippocampus: navigating between rat and human experiments. *Rev Neurosci* **16**, 87-121.

Erceg S, Monfort P, Cauli O, Montoliu C, Llansola M, Piedrafita B, Felipo V (2006) Role of extracellular cGMP and of hyperammonemia in the impairment of learning in rats with chronic hepatic failure: therapeutic implications. *Neurochem Int* **48**, 441-446.

Erceg S, Monfort P, Hernandez-Viadel M, Rodrigo R, Montoliu C, Felipo V (2005) Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology* **41**, 299-306.

- Farr SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyerman E, Butterfield DA, Morley JE (2003)** The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J Neurochem* **84**, 1173-1183.
- Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B, Freixes M, Ribe E, Dalfo E, Avila J (2005)** Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res* **2**, 3-18.
- Figueiredo-Pereira ME, Efthimiopoulos S, Tezapsidis N, Buku A, Ghiso J, Mehta P, Robakis NK (1999)** Distinct secretases, a cysteine protease and a serine protease, generate the C termini of amyloid beta-proteins Abeta1-40 and Abeta1-42, respectively. *J Neurochem* **72**, 1417-1422.
- Flood JF, Farr SA, Uezu K, Morley JE (1998)** Age-related changes in septal serotonergic, GABAergic and glutamatergic facilitation of retention in SAMP8 mice. *Mech Ageing Dev* **105**, 173-188.
- Flood JF, Morley JE (1998)** Learning and memory in the SAMP8 mouse. *Neurosci Biobehav Rev* **22**, 1-20.
- Fukunari A, Kato Y, Sakai T, Yoshimoto S, Ishiura K, Suzuki, Nakajima T (1994)** Colocalization of prolyl endopeptidase and amyloid beta-peptide in brains of senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett* **176**, 201-204.
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J y Crowther RA (1989)** Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *Embo J* **8**, 393-399.
- Guazzi M, Tumminello G, Di Marco F, Guazzi MD (2004)** Influences of sildenafil on lung function and hemodynamics in patients with chronic heart failure. *Clin Pharmacol Ther* **76**, 371-378.
- Gutierrez-Cuesta J, Sureda FX, Romeu M, Canudas AM, Caballero B, Coto-Montes A, Camins A, Pallas M (2007)** Chronic administration of melatonin reduces cerebral injury biomarkers in SAMP8. *J Pineal Res* **42**, 394-402.
- Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992)** Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* **147**, 58-62.

- Hardy J**, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356.
- Harman D** (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300.
- Hernández F**, Borrell J, Guaza C, Ávila J, Lucas JJ (2002) Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem* **83**, 1529-1533.
- Hook V**, Toneff T, Bogyo M, Medzihradzky KF, Nevenu J, Lane W, Hook G, (2005) Reisine T Inhibition of cathepsin B reduces β -amyloid production in regulated secretory vesicles of neuronal chromaffin cells: evidence for cathepsin B as a candidate β -secretase of Alzheimer's disease. *Biological Chemistry* **38**, 931-940.
- Hook VY**, Kindy M, Hook G (2008) Inhibitors of cathepsin B improve memory and reduce Abeta in transgenic Alzheimer's Disease mice expressing the wild-type, but not the Swedish mutant, beta β -secretase APP site. *J Biol Chem* **283**, 7745-53.
- Hooper C**, Killick R, Lovestone S (2008) The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **4**, 1433-1439.
- Hooper C**, Markevich V, Plattner F, Killick R, Schofield E, Engel T, Hernández F, Anderton B, Rosenblum K, Bliss T, Cooke SF, Ávila J, Lucas JJ, Giese KP, Stephenson J, Lovestone S (2007) Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur J Neurosci* **25**, 81-86.
- Hosokawa M**, Abe T, Higuchi K, Shimakawa K, Omori Y, Matsushita T, Kogishi K, Deguchi E, Kishimoto Y, Yasuoka K, Takeda T (1997) Management and design of the maintenance of SAM mouse strains: an animal model for accelerated senescence and age-associated disorders. *Exp Gerontol* **32**, 111-116.
- Ida Y**, Tanaka M, Tsuda A, Tsujimaru S, Nagasaki N (1985) Attenuating effect of diazepam on stress-induced increases in noradrenalin turnover in specific brain regions of rats. Antagonism by Ro 15-1788. *Life Sci* **37**, 2491-2498.
- Ihara Y** (2006) Neurofibrillary tangles/paired helical filaments (1981-83). *J Alzheimers Dis* **9**, 209-217.

- Ikegami I**, Shumiya S, Kawamura H (1992) Age-related changes in radial-arm maze learning and basal forebrain cholinergic systems in senescence accelerated mice (SAM). *Behav Brain Res* **51**, 15-22.
- Inada K**, Yokoi I, Kabuto H, Habu H, Mori A, Ogawa N (1996) Age-related increase in nitric oxide synthase activity in senescence accelerated mouse brain and the effect of long-term administration of superoxide radical scavenger. *Mech Ageing Dev* **89**, 95-102.
- Iqbal K**, Alonso C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* **1739**, 198-210.
- Iqbal K**, Grundke-Iqbal I (2006) Discoveries of tau, abnormally hyperphosphorylated tau and others of neurofibrillary degeneration: a personal historical perspective. *J Alzheimers Dis* **9**, 219-242.
- Jin LW**, Ninomiya H, Roch JM, Schubert D, Masliah E, Otero DA, Saitoh T (1994) Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *J Neurosci* **14**, 5461-5470.
- Kane LB**, Klings ES (2006) Present and future treatment strategies for pulmonary arterial hypertension: focus on phosphodiesterase-5 inhibitors. *Treat Respir Med* **5**, 271-282.
- Kashon ML**, Ross GW, O'Callaghan JP, Miller DB, Petrovitch H, Burchfiel CM, Sharp DS, Markesbery WR, Davis DG, Hardman J, Nelson J, White LR (2004) Associations of cortical astrogliosis with cognitive performance and dementia status. *J Alzheimers Dis* **6**, 595-604.
- Kitamura Y**, Zhao XH, Ohnuki T, Nomura Y (1989) Ligand-binding characteristics of [3H]QNB, [3H]prazosin, [3H]rauwolscine, [3H]TCP and [3H]nitrendipine to cerebral cortical and hippocampal membranes of senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett* **196**, 334-338.
- Kitamura Y**, Zhao XH, Ohnuki T, Takei M, Nomura Y (1992) Age-related changes in transmitter glutamate and NMDA receptor/channels in the brain of senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett* **137**, 169-172.
- Kukreja RC**, Salloum F, Das A, Ockaili R, Yin C, Bremer YA, Fisher PW, Wittkamp M, Hawkins J, Chou E, Kukreja AK, Wang X, Marwaha VR, Xi L (2005) Pharmacological preconditioning with sildenafil: Basic mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol* **42**, 219-232.

- Kumar VB, Farr SA, Flood JF, Kamlesh V, Franko M, Banks WA Morley JE (2000a)** Site directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides* **21**, 1769-1775.
- Kumar VB, Franko M, Banks WA, Kasinadhuni P, Farr SA, Vyas K, Choudhuri V, Morley JE (2009)** Increase in presenilin 1 (PS1) levels in senescence-accelerated mice (SAMP8) may indirectly impair memory by affecting amyloid precursor protein (APP) processing. *J Exp Biol* **212**, 494-498.
- Kumar VB, Franko MW, Farr SA, H. Armbrrecht J, Morley JE (2000b)** Identification of Age-Dependent Changes in Expression of Senescence-Accelerated Mouse (SAMP8) Hippocampal Proteins by Expression Array Analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **272**, 657-661.
- Kumar VB, Vyas K, Franko M, Choudhary V, Buddhiraju C, Alvarez J, Morley JE (2001)** Molecular cloning, expression, and regulation of hippocampal amyloid precursor protein of senescence accelerated mouse (SAMP8). *Biochem Cell Biol* **79**, 57-67.
- Kurokawa T, Asada S, Nishitani S, Hazeki O (2001)** Age-related changes in manganese superoxide dismutase activity in the cerebral cortex of senescence-accelerated prone and resistant mouse. *Neurosci Lett* **298**, 135-138.
- Kusakawa G, Saito T, Onuki R, Ishiguro K, Kishimoto T, Hisanaga S (2000)** Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem* **275**, 17166-17172.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C y Fahrenholz F (1999)** Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 3922-3927.
- Lawlor PA, Bland RJ, Das P, Price RW, Holloway V, Smithson L, Dicker BL, During MJ, Young D, Golde TE (2007)** Novel rat Alzheimer's disease models based on AAVmediated gene transfer to selectively increase hippocampal Abeta levels. *Mol Neurodegener* **2**, 11.
- Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH (2000)** Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* **405**, 360-364.

- Lovestone S**, Reynolds CH, Latimer D, Davis DR, Anderton BH, Gallo JM, Hanger D, Mulot S, Marquardt B, Stabel S (1994) Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol* **4**, 1077-1086.
- Maguire EA**, Valentine ER, Wilding JM, Kapur N (2003) Routes to remembering: the brains behind superior memory. *Nat Neurosci* **6**, 90-95.
- Mayeux R** (2003) Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* **26**, 81-104.
- McDowd JM**, FI Craik (1988) Effects of aging and task difficulty on divided attention performance. *J Exp Psychol Hum Percept Perform* **14**, 267-280.
- McGaugh JL** (1966) Time-dependent processes in memory storage. *Science* **153**, 1351-1358.
- McGeer PL**, McGeer E0 (1995) The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* **21**, 195-218.
- Meziane H**, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM y Ungerer A (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 12683-12688.
- Miyamoto M** (1994) Experimental techniques for developing new drugs acting on dementia (8)– Characteristics of behavioral disorders in senescence-accelerated mouse (SAMP8): possible animal model for dementia. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* **14**, 323–335.
- Miyamoto M** (1997) Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp Gerontol* **32**, 139-148.
- Miyamoto M**, Kiyota Y, Nishiyama M, Nagaoka A (1992) Senescence-accelerated mouse (SAM): age-related reduced anxiety-like behavior in the SAM-P/8 strain. *Physiol Behav* **51**, 979-985.
- Miyamoto M**, Kiyota Y, Yamazaki N, Nagaoka A, Matsuo T, Nagawa Y, Takeda T (1986) Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol Behav* **38**, 399-406.

- Monfort P**, Munoz MD, Kosenko E, Llansola M, Sanchez-Perez A, Cauli O, Felipo V (2004) Sequential activation of soluble guanylate cyclase, protein kinase G and cGMP-degrading phosphodiesterase is necessary for proper induction of long-term potentiation in CA1 of hippocampus: alterations in hyperammonemia. *Neurochem Int* **45**, 895-901.
- Morley JE**, Farr SA, Flood JF (2002) Antibody to amyloid beta protein alleviates impaired acquisition, retention, and memory processing in SAMP8 mice. *Neurobiol Learn Mem* **78**, 125-138.
- Morley JE**, Kumar VB, Bernardo AE, Farr SA, Uezu K, Tumosa N, Flood JF (2000) Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides* **21**, 1761-1767.
- Morris R** (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* **11**, 47-60.
- Nishiyama M**, Takahashi H, Miyamoto M (1994) Senescence-accelerated mouse (SAMP8): an animal model for age-related circadian rhythm disorder. In: Takeda T (ed) The SAM model of senescence. *Elsevier Science BV, Amsterdam*, pp 393-396.
- Nomura Y**, Okuma Y (1999) Age-related deficits in lifespan and learning ability in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* **20**, 111-115.
- Nomura Y**, Yamanaka Y, Kitamura Y, Arima T, Ohnuki T, Oomura Y, Sasaki K, Nagashima K, Ihara Y (1996) Senescence-accelerated mouse. Neurochemical studies on aging. *Ann N Y Acad Sci* **786**, 410-418.
- Ohta A**, Akiguchi I, Seriu N, Ohnishi K, Yagi H, Higuchi K, Hosokawa M (2001) Deterioration in learning and memory of fear conditioning in response to context in aged SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* **22**, 479-484.
- Ohta RJ**, Walsh DA, Krauss IK (1981) Spatial perspective taking ability in young and elderly adults. *Exp Aging Res* **7**, 45-63.
- Okatani Y**, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y (2002) Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging* **23**, 639-644.

- Pallas** M, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesus G (2008) From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis* **15**, 615-624.
- Patrick** GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**, 615-622.
- Perez** RG, Zheng H, Van der Ploeg LH, Koo EH (1997) The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J Neurosci* **17**, 9407-9414.
- Pifarre** P, Prado J, Baltrons MA, Giralt M, Gabarro P, Feinstein DL, Hidalgo J, Garcia A (2011) Sildenafil (Viagra) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* **121**, 499-508.
- Ploia** C, Antoniou X, Sclipa A, Grandea V, Cardinetta D, Colombo A, Canub N, Benussic L, Ghidonic R, Forloni G, Borsello T (2011) JNK Plays a Key Role in Tau Hyperphosphorylation in Alzheimer's disease Models. *Journal of Alzheimer's disease* **26**, 315-329.
- Poon** HF, Joshi G, Sultana R, Farr SA, Banks WA, Morley JE, Calabrese V, Butterfield DA (2004) Antisense directed at the Abeta region of APP decreases brain oxidative markers in aged senescence accelerated mice. *Brain Res* **1018**, 86-96.
- Prickaerts** J, de Vente J, Honig W, Steinbusch HW, Blokland A (2002) cGMP, but not cAMP, in rat hippocampus is involved in early stages of object memory consolidation. *Eur J Pharmacol* **436**, 83-87.
- Prickaerts** J, Sik A, van Staveren WC, Koopmans G, Steinbusch HW, van der Staay FJ, de Vente J, Blokland A (2004) Phosphodiesterase type 5 inhibition improves early memory consolidation of object information. *Neurochem Int* **45**, 915-928.
- Puerta** E, Hervias I, Barros-Miñones L, Jordan J, Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, García-Osta A, Aguirre N (2010) Sildenafil protects against 3-nitropropionic acid neurotoxicity through the modulation of calpain, CREB, and BDNF. *Neurobiol Dis* **38**, 237-245.

- Puerta E**, Hervias I, Goñi-Allo B, Lasheras B, Jordan J, Aguirre N (2009) Phosphodiesterase 5 inhibitors prevent 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced 5-HT deficits in the rat. *J Neurochem* **108**, 755-766.
- Puzzo D**, Sapienza S, Arancio O, Palmeri A (2008) Role of phosphodiesterase 5 in synaptic plasticity and memory. *Neuropsychiatr Dis Treat* **4**, 371-387.
- Puzzo D**, Staniszewski A, Deng SX, Privitera L, Leznik E, Liu S, Zhang H, Feng Y, Palmeri A, Landry DW, Arancio O (2009) Phosphodiesterase 5 inhibition improves synaptic function, memory, and amyloid-beta load in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci* **29**, 8075-8086.
- Querfurth HW**, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **362**, 329-344.
- Reichenberger F**, Voswinkel R, Steveling E, Enke B, Kreckel A, Olschewski H, Grimminger F, Seeger W, Ghofrani HA (2006) Sildenafil treatment for portopulmonary hypertension. *Eur Respir J* **28**, 563-567.
- Rodionova E**, Conzelmann M, Maraskovsky E, Hess M, Kirsch M, Giese T, Ho A D, Zoller M, Dreger P, Luft T (2007) GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood* **109**, 1584-1592.
- Rutten K**, Vente JD, Sik A, Ittersum MM, Prickaerts J, Blokland A (2005) The selective PDE5 inhibitor, sildenafil, improves object memory in Swiss mice and increases cGMP levels in hippocampal slices. *Behav Brain Res* **164**, 11-16.
- Sabbagh MN**, Walker DG, Reid RT, Stadnick T, Anand K, Lue LF (2008) Absence of effect of chronic nicotine administration on amyloid beta peptide levels in transgenic mice overexpressing mutated human APP (Sw, Ind). *Neurosci Lett* **448**, 217-220.
- Sastre M**, Klockgether T, Heneka MT (2006) Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci* **24**, 167-176.
- Sato E**, Oda N, Ozaki N, Hashimoto S, Kurokawa T, Ishibashi S (1996) Early and transient increase in oxidative stress in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mech Ageing Dev* **86**, 105-114.

- Schechter I, Ziv E (2008)** Kinetic properties of cathepsin D and BACE 1 indicate the need to search for additional beta-secretase candidate(s). *Biol Chem* **389**, 313-320.
- Schloesser RJ, Huang J, Klein PS, Manji HK (2008)** Cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* **33**, 110-133.
- Selkoe DJ (1997)** Images in neuroscience. Alzheimer's disease: from genes to pathogenesis. *Am J Psychiatry* **154**, 1198.
- Selkoe DJ (2001a)** Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**, 741-766.
- Selkoe DJ (2001b)** Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* **32**, 177-180.
- Senechal Y, Kelly PH, Dev KK (2007)** Amyloid precursor protein knockout mice show age-dependent deficits in passive avoidance learning. *Behav Brain Res* **186**, 126-132.
- Sharps MJ (1991)** Spatial memory in young and elderly adults: category structure of stimulus sets. *Psychol Aging* **6**, 309-312.
- Sheng M, Kim MJ (2002)** Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* **298**, 776-780.
- Shivers BD, Hilbich C, Multhaup G, Salbaum M, Beyreuther K, Seeburg PH (1988)** Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact. *EMBO J* **7**, 1365-1370.
- Shukitt-Hale B, Mouzakis G, Joseph JA (1998)** Psychomotor and spatial memory performance in aging male Fischer 344 rats. *Exp Gerontol* **33**, 615-624.
- Singh N, Parle M (2003)** Sildenafil improves acquisition and retention of memory in mice. *Indian J Physiol Pharmacol* **47**, 318-324.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V (1999)** Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* **402**, 537-540.

- Socała K**, Nieoczym D, Wyska E, Poleszak E, Wlaź P (2012) Sildenafil, a phosphodiesterase type 5 inhibitor, enhances the antidepressant activity of amitriptyline but not desipramine, in the forced swim test in mice. *J Neural Transm* [Epub ahead of print].
- Sureda FX**, Gutierrez-Cuesta J, Romeu M, Mulero M, Canudas AM, Camins A, Mallol J, Pallas M (2006) Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Exp Gerontol* **41**, 360-367.
- Taddei S**, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Bernini G, Magagna A, Salvetti A (2001) Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension* **38**, 274-279.
- Tajes M**, Gutierrez-Cuesta J, Folch J, Ortuño-Sahagun D, Verdaguer E, Jiménez A, Junyent F, Lau A, Camins A, Pallàs M (2010) Neuroprotective role of intermittent fasting in senescence-accelerated mice P8 (SAMP8). *Exp Gerontol* **45**, 702-710.
- Takeda T** (1999) Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiol Aging* **20**, 105-110.
- Takeda T** (2009) Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res* **34**, 639-659.
- Takeda T**, Hosokawa M, Higuchi K (1991) Senescence accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence. *J Am Geriatr Soc* **39**, 911-919.
- Takeda T**, Hosokawa M, Higuchi K (1994) Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of aging. In: Takeda T (ed) The SAM model of senescence. *Elsevier Science BV, Amsterdam*, pp 15-22.
- Takeda T**, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T (1981) A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* **17**, 183-194.
- Takeda T**, Matsushita T, Kurozumi M, Takemura K, Higuchi K, Hosokawa M (1997) Pathobiology of the senescence-accelerated mouse (SAM). *Exp Gerontol* **32**, 117-127.

- Takemura M**, Nakamura S, Akiguchi I Ueno M, Oka N, Ishikawa S, Shimada A, Kimura J, Takeda T (1993) b/A4 protein-like granular structures in the brain of senescence-accelerated mouse. *Am J Pathol* **142**, 1887-1897.
- Turenne GA**, Price BD (2001) Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. *BMC Cell Biol* **2**, 12.
- Turner RS** (2006) Alzheimer's disease. *Semin Neurol* **26**, 499-506.
- Ueno M**, Akiguchi I, Yagi H Naiki H, Fujibayashi Y, Kimura J, Takeda T (1993) Age-related changes in barrier function in mouse brain I. Accelerated age-related increase of brain transfer of serum albumin in accelerated senescence prone SAM-P/8 mice with deficits in learning and memory. *Arch Gerontol Geriatr* **16**, 233-248.
- Ueno M**, Dobrogowska DH, Vorbrodt AW (1996) Immunocytochemical evaluation of the blood-brain barrier to endogenous albumin in the olfactory bulb and pons of senescence- accelerated mice (SAM). *Histochem Cell Biol* **105**, 203-212.
- Uthayathas S**, Karuppagounder SS, Thrash BM, Parameshwaran K, Suppiramaniam V, Dhanasekaran M (2007) Versatile effects of sildenafil: recent pharmacological applications. *Pharmacol Rep* **59**,150-163.
- Vassar R**, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735-741.
- Wang L**, Gang Zhang Z, Lan Zhang R, Chopp M (2005) Activation of the PI3-K/Akt pathway mediates cGMP enhanced-neurogenesis in the adult progenitor cells derived from the subventricular zone. *J Cerebr Blood Flow Metab* **25**, 1150-1158.
- Weber RJ**, Brown LT, Weldon JK (1978) Cognitive maps of environmental knowledge and preference in nursing home patients. *Exp Aging Res* **4**, 157-174.
- Wei X**, Zhang Y, Zhou J (1999) Alzheimer's disease-related gene expression in the brain of senescence accelerated mouse. *Neurosci Lett* **26**, 139-142.

- Wiltfang** J, Esselmann H, Bibl M, Hull M, Hampel H, Kessler H, Frolich L, Schroder J, Peters O, Jessen F, Luckhaus C, Pernecky R, Jahn H, Fiszer M, Maler JM, Zimmermann R, Bruckmoser R, Kornhuber J, Lewczuk P (2007) Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not A beta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A beta 40 load. *J Neurochem* **101**, 1053-1059.
- Wu** Y, Zhang AQ, Yew DT (2005) Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. *Neurochem Int* **46**, 565-574.
- Yagi** H, Katoh S, Akiguchi I, Takeda T (1988) Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence accelerated mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory. *Brain Res* **22**, 86-93.
- Yamazaki** T, Koo EH, Selkoe DJ (1996) Trafficking of cell-surface amyloid betaprotein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *J Cell Sci* **109**, 999-1008.
- Yang** AJ, Chandswangbhuvana D, Shu T, Henschen A, Glabe CG (1999) Intracellular accumulation of insoluble, newly synthesized abetan-42 in amyloid precursor protein-transfected cells that have been treated with Abeta1-42. *J Biol Chem* **274**, 20650-20656.
- Yang** ZZ, Tschopp O, Baudry A, Dümmler B, Hynx D, Hemmings BA (2004) Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem Soc Trans* **32**, 350-354.
- Yoshida** H, Hastie CJ, McLauchlan H, Cohen P, Goedert M (2004) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK). *J Neurochem* **90**, 352-358.
- Younkin** SG (1998) The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris* **92**, 289-292.
- Zhang** R, Wang Y, Zhang L, Zhang Z, Tsang W, Lu M, Zhang L Chopp M (2002) Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats. *Stroke* **33**, 2675-2680.
- Zhang** RL, Zhang Z, Zhang L, Wang Y, Zhang C, Chopp M (2006) Delayed treatment with sildenafil enhances neurogenesis and improves functional recovery in aged rats after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* **83**, 1213-1219.

Zhou JW, Cheng XR, Cheng JP, Zhou WX, Zhang YX (2012) The activity and mRNA expression of β -secretase, cathepsin D, and cathepsin B in the brain of senescence-accelerated mouse. *J Alzheimers Dis* **28**, 471-480.

CAPÍTULO II

Capítulo 2

Planteamiento y Objetivos

Debido al aumento de la esperanza de vida y a la disminución de la tasa de natalidad, la proporción de personas mayores de 60 años está aumentando más rápidamente que cualquier otro grupo de edad en casi todos los países. El envejecimiento de la población puede considerarse un éxito de las políticas de salud pública y el desarrollo socioeconómico, pero también constituye un reto para la sociedad, que debe adaptarse a ello para mejorar al máximo la salud y la capacidad funcional de las personas mayores, así como su participación social y su seguridad. La enciclopedia británica define el envejecimiento como “El cambio gradual e intrínseco en un organismo que conduce a un riesgo creciente de vulnerabilidad, pérdida de vigor, enfermedad y muerte”. No existe una teoría sobre el envejecimiento que pueda explicarlo completamente, posiblemente se deba a una serie de factores que interactúan sobre el organismo a lo largo del tiempo. El envejecimiento es un proceso universal y heterogéneo del que falta mucho por comprender. Estamos lejos de encontrar la “formula de la eterna juventud”, si bien, más importante que dar años a la vida, es dar vida a los años, o lo que es lo mismo: aumentar la “calidad de vida”. Esto explica el interés creciente por desentrañar los interrogantes que encierra el envejecimiento y así mejorar la calidad de vida de las personas mayores además de disminuir las patologías asociadas a dicho proceso.

Tal como ha quedado expuesto en la introducción, el ratón de senescencia acelerada SAMP8 ha sido propuesto como un buen modelo para el estudio de las bases moleculares que subyacen al deterioro cognitivo asociado a la edad así como a la EA esporádica ya que, además de presentar alteraciones cognitivas, estos animales muestran los principales marcadores histopatológicos de dicha enfermedad neurodegenerativa. A pesar de que son numerosos los estudios centrados en determinar cuáles son los mecanismos intracelulares responsables de dichas alteraciones, éstos aún no se conocen con exactitud. El presente trabajo tiene como objetivo general el estudio de las principales cascadas de señalización intracelular implicadas en el efecto beneficioso del sildenafil sobre las patologías tau y amiloide responsables de los déficits cognitivos que presenta este modelo animal a distintas edades. Además, un mayor conocimiento sobre estas vías de señalización nos permitirá identificar nuevas dianas terapéuticas así como proponer potenciales fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento.

Los objetivos concretos del presente trabajo son:

1. Teniendo en cuenta estudios previos que demuestran el potencial beneficioso de los inhibidores de la PDE5 en el SNC, nos planteamos, como primer objetivo, valorar el efecto del sildenafil sobre el deterioro cognitivo que muestran los ratones SAMP8 a los 6 y 9 meses de edad.

2. A continuación, una vez demostrado el efecto beneficioso del sildenafil sobre los déficits cognitivos que muestran estos animales, nos propusimos determinar los mecanismos moleculares responsables de dicho efecto. En concreto se analizó el:

2.1. Efecto del sildenafil sobre la patología tau en ratones SAMP8 y SAMR1 de 6 y 9 meses de edad. En particular se analizará la modulación por sildenafil de las principales cascadas intracelulares responsables de la fosforilación de tau, las vías Cdk5/p25 y Akt/GSK-3 β , así como los niveles de fosforilación de la proteína tau en distintos residuos. El desarrollo de este objetivo se corresponde con el capítulo III.

2.2. Efecto del sildenafil sobre el procesamiento amiloidogénico de la APP y los niveles del péptido A β en ratones SAMP8 y SAMR1 de 9 meses de edad. Para ello, se pretende valorar el efecto de sildenafil sobre dos de las principales β -secretasas responsables del procesamiento amiloidogénico, BACE1 y Catepsina B, así como sus principales proteínas moduladoras, calpaína/p25 y Akt/GSK-3 β respectivamente. El desarrollo de este objetivo queda reflejado en el capítulo IV.

2.3. Efecto del sildenafil sobre JNK y la implicación de esta cinasa en la patología tau y en el déficit cognitivo que se observa en los ratones SAMP8 de 6 meses de edad. Con este fin, se administrará un inhibidor de p-JNK a los ratones y se estudiará el estado de fosforilación de la proteína tau. Este objetivo se desarrolla en el capítulo V.

CAPÍTULO III

Chapter 3

Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model

Lourdes Orejana, Lucía Barros-Miñones, Joaquín Jordán, Elena Puerta,
Norberto Aguirre

Neurobiology of Aging, 2012, published

Resumen

El envejecimiento está asociado con un deterioro de la capacidad cognitiva y con un aumento del riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas. En el presente estudio, quisimos probar si el inhibidor específico de la fosfodiesterasa 5 sildenafil, podría mejorar el deterioro cognitivo asociado a la edad que presenta el ratón con tendencia al envejecimiento acelerado SAMP8. La administración de sildenafil (7.5 mg/kg durante 4 semanas) a ratones SAMP8 de 6 meses de edad produjo revirtió el deterioro del aprendizaje y de la memoria espacial que mostraron estos animales en el Test del Laberinto Acuático de Morris. También se observó una disminución de la hiperfosforilación de la proteína tau (epítipo AT8 pero no PHF-1) en el hipocampo de los ratones tratados con el fármaco. Este efecto podría estar ligado a la disminución de la expresión cinasa dependiente de ciclina (Cdk5), así como en su actividad (ratio p25/p35). Por otro lado, el sildenafil fosforila a la proteína Akt, hecho que se asocia con un aumento en la fosforilación de la cinasa glicógeno sintasa 3 β (GSK-3 β). Este efecto podría explicar la reducción de la hiperfosforilación de tau observada tanto en el epítipo AT8 como en el PHF-1 y la mejora del déficit cognitivo que presentaron los ratones SAMP8 de 9 meses de edad. Por todo ello, el sildenafil podría ser un fármaco beneficioso en los trastornos cerebrales asociados a la edad y, podría proponerse como candidato emergente para el tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas.

Abstract

Aging is associated with a deterioration of cognitive performance and with increased risk of neurodegenerative disorders. In the present study we tested whether the specific phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil could ameliorate the age-dependent cognitive impairments shown by the senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8). Sildenafil administration (7.5 mg/kg for 4 weeks) to 6-month old SAMP8 mice attenuated spatial learning and memory impairments shown by these mice in the Morris Water Maze. Tau hyperphosphorylation (AT8 but not PHF-1 epitope) shown by SAMP8 mice at this age was also decreased in the hippocampus of sildenafil-treated mice, an effect probably related to a decrease in cyclin-dependent kinase 5 protein expression and activity (p25/p35 ratio). Interestingly, sildenafil also phosphorylated Akt, which was associated with an increase of glycogen synthase kinase-3 β phosphorylation, providing a plausible explanation for the reductions in tau hyperphosphorylation (AT8 and PHF-1 epitopes) and attenuation of cognitive deficits shown by 9-month-old SAMP8 mice. Overall, sildenafil might be beneficial in age-related brain dysfunction and could be an emerging candidate for the treatment of other neurodegenerative diseases.

Keywords:

Aging; Akt; Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5); Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β); SAMP8; Senescence accelerated; Sildenafil; Tau

1. Introduction

Aging in humans, as well as in experimental animals, is associated with a deterioration of cognitive performance particularly of learning and memory and with increased risk of neurodegenerative disorders (Barzilai et al., 2006; Mehta, 2007). Undoubtedly, identifying the key markers and how they interact to turn benign aging into pathologic seems a crucial step for the development of therapeutic strategies to prevent or hinder the progression of aging and neurodegenerative diseases.

The senescence-accelerated mouse (SAM) is comprised of 14 strains derived from selective inbreeding of the AKR/J strain (Takeda et al., 1981). One of these substrains, the senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) strain manifests irreversible advancing senescence and shares similar characteristics with aged humans such as a reduced lifespan, lordosis, hair loss, and reduced physical activity (Hamamoto et al., 1984; Takeda et al., 1994), whereas the senescence-accelerated mice resistant-1 (SAMR1) strain presents a normal aging pattern (Takeda, 1999). Interestingly, SAMP8 mice also exhibit age-related learning and memory deficits, as well as amyloid-like deposits in the brain (Del Valle et al., 2010; Tomobe and Nomura, 2009). Among other changes, increased expression of hyperphosphorylated tau has also been detected in SAMP8 mice (Canudas et al., 2005). Given such features, SAMP8 mice have been proposed as 1 plausible age-associated Alzheimer's disease (AD) animal model (Liu et al., 2010; Pallas et al., 2008), and a suitable rodent model for studying the molecular mechanisms underlying cognitive impairment in aged subjects (Tomobe and Nomura, 2009).

Sildenafil is a phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitor initially approved for the treatment of erectile dysfunction and nowadays also for pulmonary arterial hypertension (Mostafa, 2008). Besides its medical applications, several studies have shown that sildenafil improves memory in rats (Prickaerts et al., 2002) and mice (Baratti and Boccia, 1999; Rutten et al., 2005) and attenuates cognitive deficits caused by nitric oxide synthase inhibition, blockade of muscarinic cholinergic receptor (Devan et al., 2004; 2006; 2007), diabetes, or electroconvulsive shock (Patil et al., 2006). Moreover, Puzzo et al. (2009) have recently demonstrated that sildenafil also restores the cognitive function in a transgenic mouse model of AD.

Based on these premises, the aim of the present study was to explore whether sildenafil could reverse the memory impairments shown by SAMP8 mice as well as the underlying mechanisms. In particular, we focused our study on the effects of sildenafil on tau pathology based on several lines of evidence from transgenic mice and humans indicating a strong correlation between the extent of tau pathology and cognitive dysfunction (Arriagada et al., 1992; Ashe and Zahs, 2010; Bancher et al., 1993; Guillozet et al., 2003).

2. Materials and Methods

2.1. Drugs and chemicals

1-[4-ethoxy-3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1Hpyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl) phenylsulfonyl]-4-methylpiperazine citrate was from Pfizer (Sildenafil citrate, Viagra™; New York, NY, USA); all other chemicals were from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Animals, treatments, and experimental design

Experiments were carried out in male SAMP8 (28–30 g) and SAMR1 mice (32–35 g) obtained from Harlan (Harlan Iberica, Barcelona, Spain). Animals were housed (5 per cage) in constant conditions of humidity and temperature (22 ± 1 °C) with a 12-hour/12-hour light-dark cycle (lights on at 7:00 hours). Food and water were available ad libitum. All the procedures followed in this work were in compliance with the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and were approved by the Ethical Committee of the University of Navarra.

To study the effect of sildenafil on cognitive impairment, 5- and 8-month-old male SAMP8 and SAMR1 mice were treated once daily with sildenafil (7.5 mg/kg intraperitoneally [i.p.]) or saline for 4 consecutive weeks. The dose of sildenafil was chosen to simulate the dose for a patient of 80 kg body weight after taking a 50-mg tablet of Viagra™ according to Reagan-Shaw et al. (2008), and it is in the range of those previously used by other authors (e.g., Ding et al., 2008; Zhang et al., 2005). Drug administration started 2 weeks before the beginning of the Morris water maze test (MWM) and extended throughout the duration of the behavioural test (17 days). During these days, sildenafil was given at the end of the session. The last injection was administered 3 hours before the mice were killed.

Solutions of sildenafil were prepared by grinding Viagra™ tablets into powder and dissolved in saline. The drug solutions were filtered (22 µm pore size) before administration.

2.3. Morris water maze test (MWM)

The MWM, a hippocampus-dependent learning task, was used to test spatial memory and to evaluate the working and reference memory function in response to treatment with sildenafil in SAMP8 and SAMR1 mice, as previously described (Ricobaraza et al., 2009).

To test spatial memory in response to treatment with sildenafil in SAMP8 and SAMR1 mice, the Morris Water Maze (MWM) was performed. The water maze was a circular pool (diameter of 145 cm) filled with water (21-22°C) and virtually divided into four equal quadrants identified as northeast, northwest, southeast, and southwest. Mice underwent visible-platform training for 3 consecutive days (8 trials/day) in which a platform was located in the southwest quadrant raised above the water. Mice that were unable to reach the platform, exhibiting abnormal swimming patterns or persistent floating were excluded from data analyses. Hidden-platform training was conducted with the platform placed in the northeast quadrant 1 cm below the water surface over 9 consecutive days (4 trials/day). Several large visual cues were placed in the room to guide the mice to the hidden platform. Each trial was finished when the mouse reached the platform (escape latency) or after 60 s, whichever came first. Mice failing to reach the platform were guided onto it. After each trial mice remained on the platform for 15 s. To test memory retention, three probe trials were performed at the beginning of the 4th, 7th, and the last day of the test (day 9). In the probe trials the platform was removed from the pool and mice were allowed to swim for 60 seconds. The percent of time spent in the target quadrant was recorded.

To evaluate synaptic plasticity and using the same pool and conditions as for the MWM, mice again had to find a submerged platform in the reverse MWM (Timmer et al., 2010). This time, the platform was moved to the opposite quadrant of the pool. The escape latency to find the new platform location was measured for 4 days (4 trials/day). The probe test was performed at the beginning of the third and the last day of the test (day 5 of the reversal test). The same parameters as for the MWM were analyzed. All trials were monitored by a video camera set above the center of the pool and connected to a video tracking system (Ethovision 3.0; Noldus Information Technology BV, Wageningen, Netherlands).

2.4. Western blot analysis

Western blot analysis was carried out in hippocampal tissues collected from mice killed 3 hours after the last administration of sildenafil. Tissue homogenates were obtained as described elsewhere (Goñi-Allo et al., 2008). Proteins (20 µg) were separated by electrophoresis on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (10%) under reducing conditions. Membranes were probed overnight at 4°C with the following primary antibodies: antiphospho- Akt Ser473, rabbit monoclonal anti-Akt, rabbit polyclonal anti-pGSK-3β (Ser9), rabbit monoclonal anti-p35/p25 and rabbit monoclonal anti-Cdk5 (1:1000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA); rabbit polyclonal anti-GSK-3β, (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); mouse monoclonal anti-p-tau AT8 (1:1000 Pierce Biotechnology, Inc, Rockford, IL, USA); mouse monoclonal anti tau clone Tau46 and mouse monoclonal anti-actin (1:1000 and 1:15,000 respectively, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and mouse anti-PHF-1 (1:500, gift from Dr. J. Avila, CBM, Madrid, Spain). Proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence (ECL™) western blotting detection reagent (Amersham, Buckinghamshire, England) and band intensity was estimated densitometrically on a GS-800 calibrated densitometer (Biorad One, Madrid, Spain).

2.5. Statistical analysis

Results were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). In the acquisition phase of the MWM, treatment effects were analyzed by 2-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures followed by Tukey post hoc test. Neurochemical data and the time spent in the target quadrant on the probe trial of the MWM were analyzed using 2-way ANOVA (strain*treatment) followed by Tukey post hoc test. In 3. Results, the *F* values concerning the neurochemical data represent the *F* of interaction followed by the *p*-value of the corresponding post hoc test. In those cases where the *F* of interaction was not statistically significant the *F* value shown represents the main effect observed strain or treatment. Treatment differences were considered statistically significant at *p* < 0.05. Data analyses were performed using the Statistical Program for the Social Sciences (SPSS for Windows, 15.0; SPSS, Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Effect of sildenafil on spatial learning and memory deficits in SAMP8 mice

3.1.1. Effect of sildenafil on performance of 6 month-old SAMP8 and SAMR1 mice in the MWM test

First of all, we analyzed the swim speed of 6-month-old mice on the first trial of the first session in the hidden platform training before subjects from any group knew the location of the platform. There was no difference in swimming speed (data not shown) or sensorimotor function (measured by visible platform trial) among the 4 groups (Fig. 1A), which enabled us to exclude the effect of motivational and sensorimotor factors on animal learning and memory performance. We then used the escape latency for the evaluation of spatial learning and memory of mice.

As shown in Fig. 1B, escape latencies of SAMR1 mice were shorter than those of SAMP8 groups during the hidden platform trial. Furthermore, the latencies to find the submerged platform significantly declined every day in the SAMR1 group while such phenomenon could not be seen in SAMP8 mice, indicating the existence of learning deficits in these mice. However, sildenafil-treated SAMP8 mice showed a marked improvement in their behavioral performance as their escape latencies on days 6, 7, and 8 were significantly shorter than SAMP8 mice treated with saline. No significant differences were found between saline or sildenafil-treated SAMR1 mice.

At the beginning of the fourth, seventh, and ninth day, all mice were subjected to a probe trial in which they swam in the pool with the platform removed as a putative measurement of memory retention. It has been suggested that the sensitivity of the MWM test increases by giving shorter probe trials (Gerlai, 2001). Thereby, we analyzed the performance of mice during the first 15 seconds. As shown in Fig. 1C, SAMP8 control mice spent significantly less time in the target quadrant than SAMR1 mice. On day 7 in the probe test, a significant interaction between strain and treatment was observed [$F = 7.469$, $p < 0.05$]. Further analysis revealed that there were significant differences between SAMP8 and SAMR1 saline-treated mice ($p < 0.05$). Moreover, comparisons between saline and sildenafil treated groups indicated that SAMP8 mice treated with sildenafil spent more time in the target

quadrant than saline SAMP8 mice ($p < 0.05$), whereas no differences were observed between saline or sildenafil-treated SAMR1 mice.

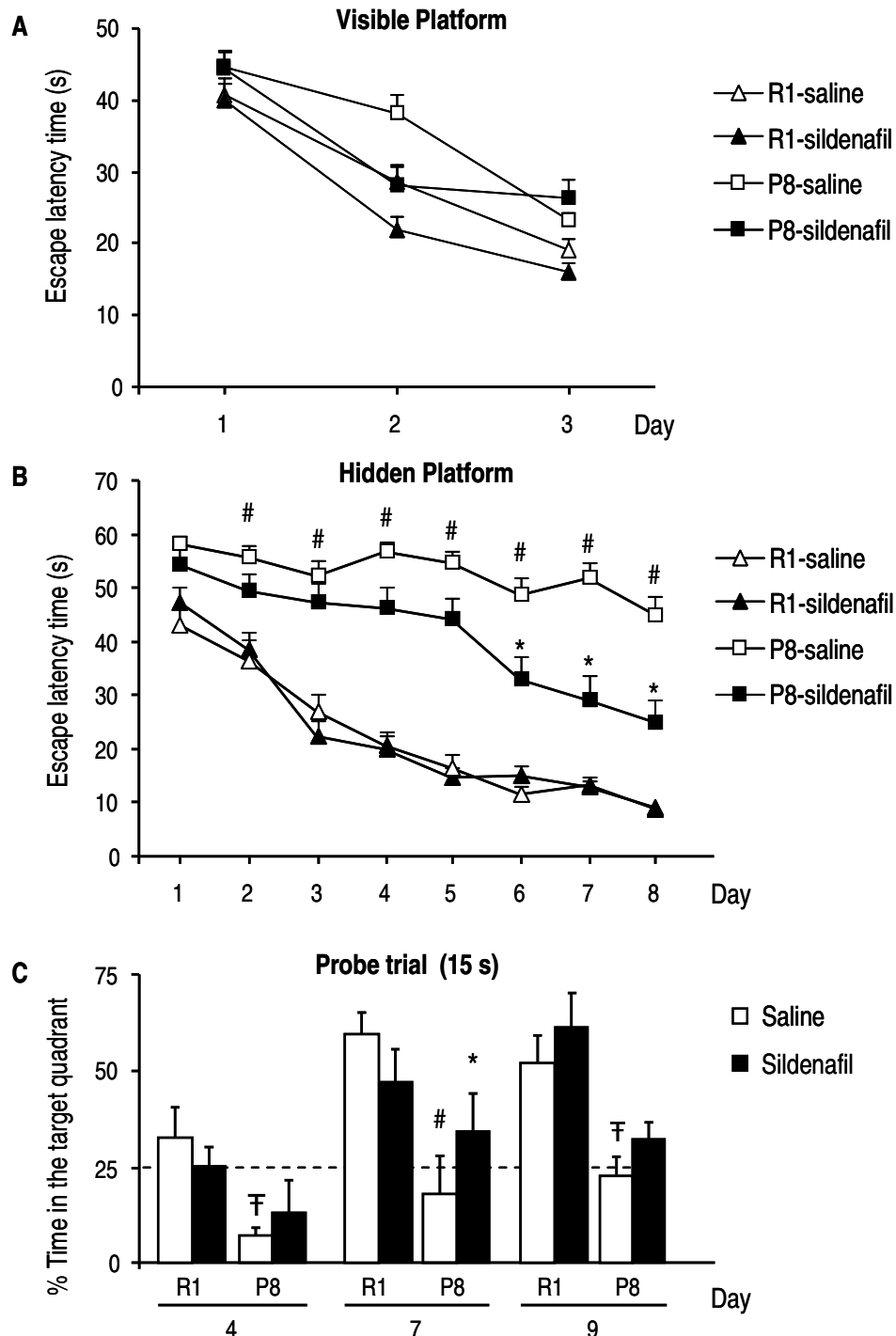


Figure 1. Effect of sildenafil on the performance of 6-month old senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) and senescence-accelerated mice resistant-1 (SAMR1) mice in the Morris water maze test (MWM). Sildenafil (7.5 mg/kg intraperitoneally [i.p.]) or saline was administered for 4 weeks every 24 hours beginning 2 weeks before the learning task. (A) Escape latency in the visible platform phase. No significant differences were detected among groups. (B) Escape latency in the hidden platform phase. SAMP8 mice had significant higher escape latency than SAMR1 mice, an effect reversed by sildenafil. (C) In the probe trial data are presented as percentage of time spent in the target quadrant. A main effect of strain was observed on days 4 and 9. On the seventh day sildenafil administration to SAMP8 mice significantly increased the time spent in the target quadrant. Results are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM) ($n = 7-9$). $\dagger p < 0.05$ main effect of strain, $\# p < 0.05$ versus SAMR1-saline, $* p < 0.05$ versus SAMP8-saline. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test.

A reverse MWM was performed for 5 days to assess whether mice could unlearn irrelevant information and relearn a new platform location at the opposite quadrant of the pool. As shown in Fig. 2A, SAMP8 mice treated with saline were impaired in their performance in this test when compared with SAMR1 mice. Interestingly, sildenafil administration to SAMP8 mice improved the performance of these animals. This improvement was statistically significant on the last day of the task. The escape latency of saline and sildenafil-treated SAMR1 did not differ.

Similarly, the analysis of the first 15 seconds of the probe test of the reverse MWM revealed that, on the last day, there was a significant interaction between strain and treatment [$F = 3.785$, $p < 0.05$]. Further analysis revealed that sildenafil-treated SAMP8 mice spent in the target quadrant significantly more time than saline-treated SAMP8 mice ($p < 0.05$). Sildenafil did not affect the performance of SAMR1 mice.

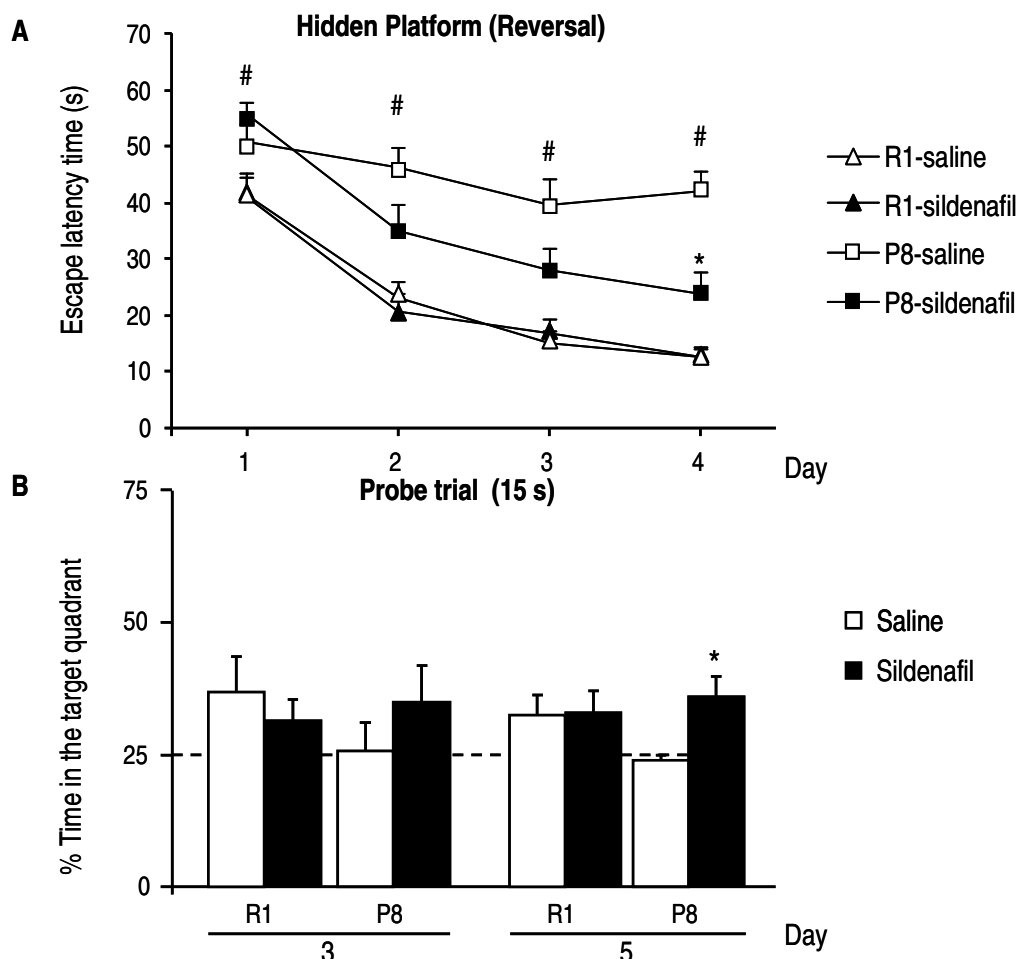


Figure 2. Effect of sildenafil on the performance of 6-month old senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) and senescence-accelerated mice resistant-1 (SAMR1) mice in the reverse Morris water maze test (MWM). Sildenafil (7.5 mg/kg i.p) or saline was administered for 4 weeks every 24 hours starting 2 weeks before the learning task. (A) Escape latency in the hidden platform phase. SAMP8 mice had significant higher escape latency than SAMR1 mice. Note that sildenafil administration decreased escape latency of SAMP8 mice. (B) Retention phase of the reversal MWM. Data are presented as percentage of time spent in the target quadrant. Results are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM) ($n = 7-9$). [#] $p < 0.05$ versus SAMR1-saline, ^{*} $p < 0.05$ versus SAMP8-saline. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test.

3.1.2. Effect of sildenafil on performance of 9 month-old SAMP8 and SAMR1 mice in the MWM test.

As shown in Fig. 3A SAMR1 mice had significantly lower escape latencies than SAMP8. Furthermore, we found that sildenafil treated SAMP8 mice performed much better than saline-SAMP8 mice and were able to acquire a mean escape latency of less than 30 sec by the 7th day of hidden platform. Noteworthy, the learning ability of SAMR1 mice treated with sildenafil exceeded that of saline SAMR1 animals in the 4th day of the test. No significant differences were found on the visible platform training (data not shown) suggesting that all the groups were able to perform the test.

In probe trial, time spent in the target quadrant for the first 15 seconds was measured. As shown in Fig. 3B on day 7 a main effect of the strain was observed [$F=7.155$, $p<0.01$]. On day 9 in the probe test, an interaction between strain and treatment was observed [$F=7.469$, $p<0.05$]. Further analysis revealed that SAMP8 mice spent significantly less time in the target quadrant than SAMR1, an effect reversed when SAMP8 mice were treated with sildenafil. The results indicate that SAMR1 and sildenafil-treated SAMP8 animals tended to learn correctly the platform location, whereas saline-treated SAMP8 did not.

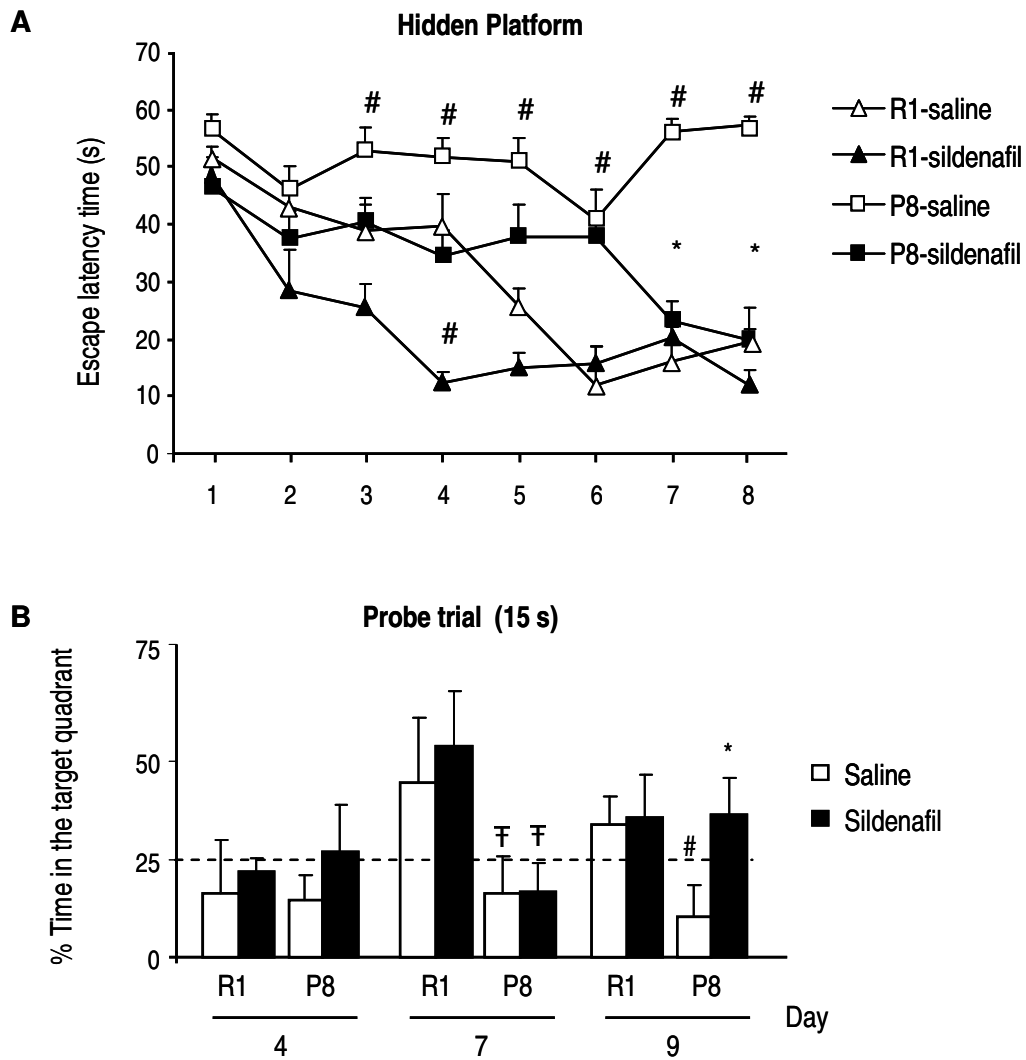


Figure 3. Effect of sildenafil on performance of 8 month old SAMP8 and SAMR1 mice in the MWM test. Sildenafil (7.5 mg/kg i.p) or saline was administered for 4 weeks every 24 hours beginning two weeks before the learning task. Panel A: Escape latency in the invisible platform phase. SAMP8 mice had significantly higher escape latencies than SAMR1 mice, an effect reversed by sildenafil. Panel B: In the probe trial data are presented as percentage of time spent in the target quadrant. A main effect of strain was observed on day 7. On the 9th day sildenafil significantly increased the time spent in the target quadrant in SAMP8 mice. Results are shown as mean \pm SEM (n = 6). $\bar{\tau}$ p<0.05 main effect of strain, #p<0.05 vs R1-saline, *p<0.05 vs P8-saline. Two-way ANOVA followed by Tukey's test.

3.2. Effect of sildenafil on tau pathology

3.2.1. Role of Cdk5/p25-p35 pathway

As depicted in Fig. 4A, sildenafil significantly decreased cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) levels in the hippocampus of SAMP8 mice compared with saline-treated SAMP8 animals [$F=11.471$, $p < 0.05$]. Next, we evaluated changes in the proteolytic fragment of p35, p25, which may be responsible for Cdk5 activation. Western blot analysis revealed a significant increase in the p25/p35 ratio in SAMP8 mice compared with SAMR1 [$F = 4.501$, $p < 0.05$]. Interestingly, p25 expression levels found in saline-treated SAMP8 animals was markedly decreased by sildenafil treatment ($p < 0.05$) (Fig. 4B).

We therefore tested whether sildenafil would reverse tau pathology in SAMP8 mice using a phospho-specific antibody, AT8, which recognizes aberrantly phosphorylated epitopes on Ser202/Thr205 and which is considered to be the most appropriated antibody for measurement Cdk5-induced tau phosphorylation (Augustinack et al., 2002). As shown in Fig. 4C, Western blot analysis revealed that phosphorylated tau levels normalized to total tau (detected by T46 antibody) were significantly increased in saline-treated SAMP8 mice compared with SAMR1 mice [$F = 4.684$, $p < 0.05$]. Importantly, sildenafil treatment resulted in significant decreased levels of phosphorylated tau when compared with SAMP8 receiving saline ($p < 0.05$).

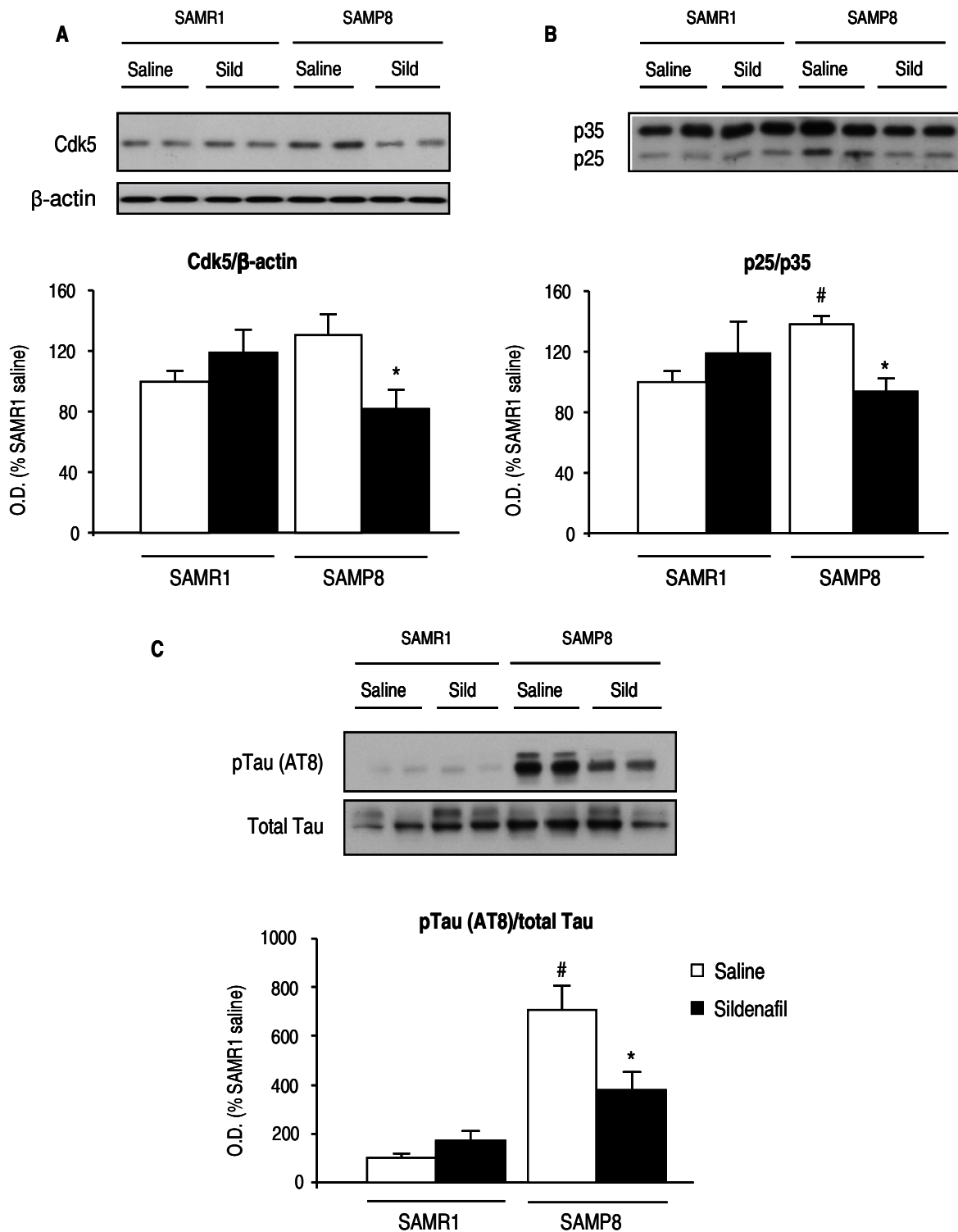


Figure 4. Sildenafil regulates tau phosphorylation through cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)/p25-p35 pathway in senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) mice. Sildenafil (7.5 mg/kg intraperitoneally [i.p.]) was administered every 24 hours for 4 weeks to 5-month old SAMP8 and senescence-accelerated mice resistant-1 (SAMR1) mice. Mice were killed 3 hours after the last saline or sildenafil injection. (A) Western blots showing Cdk5 protein bands (30 kDa) in the hippocampus of mice treated with saline or sildenafil. β -actin was used as equal loading control. (B) Top: Representative Western blot showing hippocampal p35 and p25 protein bands and quantitative measurement of p25/p35 ratio. (C) Western blot analysis of phosphorylated tau (AT8) levels (40–50 kDa) normalized to total tau. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) ($n=7-9$). # $p<0.05$ versus SAMR1-saline, * $p<0.05$ versus SAMP8-saline. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test.

3.2.2. Role of Akt/GSK-3 β pathway

Because glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) phosphorylates tau at Ser396 and Ser404 (PHF-1) (Augustinack et al., 2002), levels of phospho-tau, using a phospho-specific antibody, PHF-1, normalized to total tau were measured. In this case, however, no differences were found in 6-month-old SAMP8 mice when compared with SAMR1 (Fig. 5A).

Taking into account a recent study by Del Valle et al. (2010), showing that another key feature of SAMP8 mice such as amyloid deposits worsens with age, we also analyzed tau phosphorylation in 9-month-old mice. In line with their study, we found that 9-month-old SAMP8 mice had significantly higher levels of not only AT8 phospho-tau epitope [$F = 6.136$, $p < 0.05$] but also of PHF-1 [$F = 4.347$, $p < 0.05$] (Fig. 5B). As in the case of younger animals, sildenafil (7.5 mg/kg i.p., for 4 weeks) decreased AT8 immunoreactivity ($p < 0.05$) and also PHF-1 ($p < 0.05$). Interestingly, the decreased levels of phospho-tau after sildenafil treatment was accompanied with a significant improvement of the severe memory impairment that these mice have at this age on the MWM (Fig. 3)

It has been reported that sildenafil increases Akt phosphorylation (Puerta et al., 2009; Wang et al., 2005). In order to explore whether the Akt pathway is involved in sildenafil-reduced PHF-1 immunoreactivity, we measured the phosphorylation levels of Akt and its downstream target, GSK-3 β at Ser9, an effect known to inhibit its kinase activity. As shown in Fig. 6A sildenafil markedly increased phosphorylated Akt compared with saline-treated animals [$F = 3.149$, $p < 0.05$; main effect of treatment]. Consistent with a posttranscriptional regulation, total Akt protein levels remain unaltered. This result strongly correlated with those observed after analyzing the levels of inactive GSK-3 β form (p-GSK-3 β ; Ser9) normalized to total GSK-3 β levels [$F = 9.091$, $p < 0.01$; main effect of treatment] (Fig. 6B). These data suggest that, in old SAMP8 mice, sildenafil induces a reduction in phospho-tau probably through the modulation of Cdk5/p25/p35 and Akt/GSK-3 β pathways.

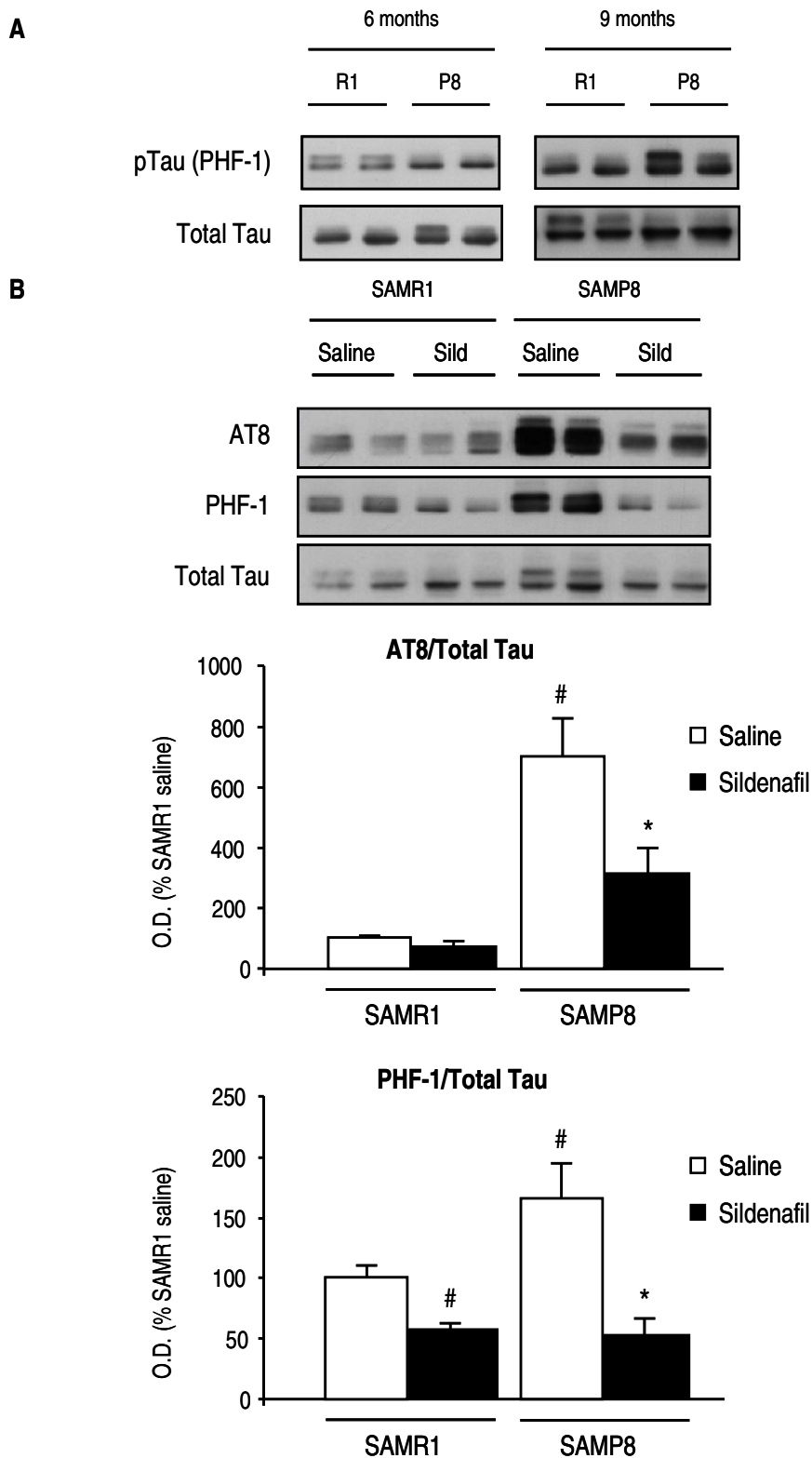


Figure 5. Phosphorylation of tau protein in senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) and senescence-accelerated mice resistant-1 (SAMR1) mice. (A) Representative Western blot showing hippocampal phosphorylated tau at Ser396 and Ser404 (PHF-1), and total tau levels of 6- and 9-month old SAMP8 and SAMR1 mice. Note that differences were found only in 9-but not 6-month old SAMP8 versus SAMR1 mice. (B) Sildenafil decreased phospho-tau (AT8 and PHF-1) levels in 9-month old SAMP8 mice. Sildenafil (7.5 mg/kg intraperitoneally [i.p.]) was administered every 24 hours for 4 weeks starting at 8 months of age. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) ($n = 6$). # $p < 0.05$ versus SAMR1-saline, * $p < 0.05$ versus SAMP8-saline. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test.

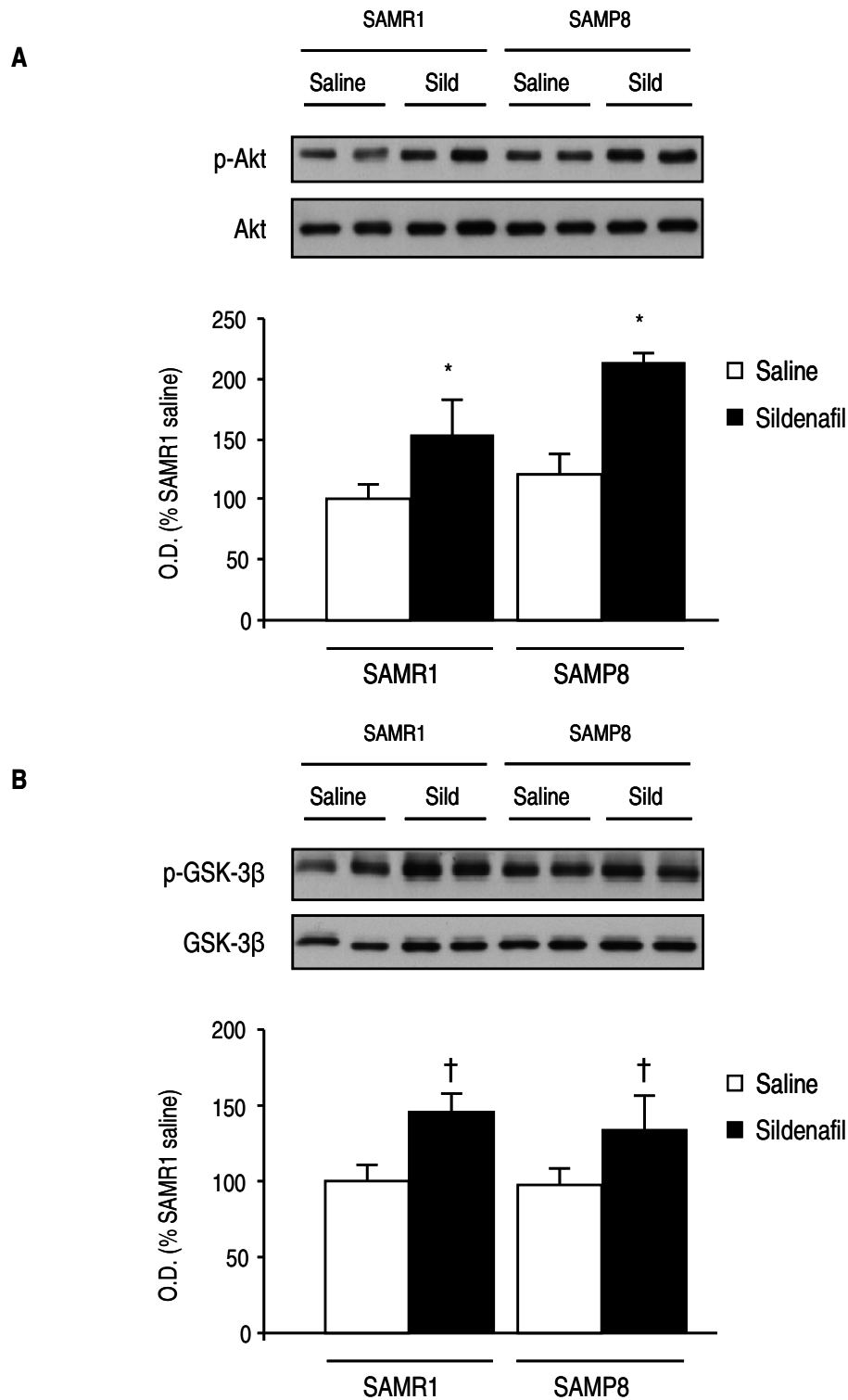


Figure 6. Sildenafil increases phospho-Akt and phospho-glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) in the hippocampus of senescence-accelerated mice resistant-1 (SAMR1) and senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) mice. Sildenafil (7.5 mg/kg intraperitoneally [i.p.]) was administered every 24 hours for 4 weeks and mice were killed 3 hours after the last saline or sildenafil injection. (A) Phosphorylated Akt levels (60 kDa) normalized to total Akt. (B) Phosphorylated GSK-3 β (Ser9) levels (46 kDa) normalized to total GSK-3 β . Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) ($n = 7-9$). * $p < 0.05$ and † $p < 0.01$ main effect of treatment. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test.

4. Discussion

In the present study we demonstrate, for the first time, that the specific PDE5 inhibitor sildenafil, at a dose comparable to that used in humans, exerts a protective effect on the learning and memory impairments shown by SAMP8 mice in the MWM. Moreover, sildenafil decreased tau hyperphosphorylation, an effect that could be mediated by the modulation of Cdk5/p25 and Akt/GSK-3 β pathways.

Consistent with previous reports, 6-month-old SAMP8 mice presented learning and memory impairments in the MWM when compared with age matched SAMR1 mice, an effect that was markedly ameliorated by sildenafil. Importantly, swimming velocity was similar in all groups indicating that the effects caused by sildenafil were independent of any effect on motor activity. In an attempt to elucidate the mechanisms underlying the beneficial effects of sildenafil we focused our study on tau because tau hyperphosphorylation has been described in 5-month-old SAMP8 mice and has been directly implicated in neurofibrillary degeneration and accelerated aging process in this senescence mouse model (Canudas et al., 2005; García-Matas et al., 2008; Sureda et al., 2006).

Tau is a low molecular weight microtubule-associated protein, which plays critical roles in stabilizing microtubules and inducing its own assembly (Maccioni and Cambiazo, 1995). Abnormal phosphorylation of tau substantially reduces its affinity for microtubules promoting microtubule disassembly and tau aggregation into paired helical filaments, which turn into neurofibrillary tangles found in neurons (and sometimes in glia) of patients with neurological disorders such as AD and other tauopathies (Alonso et al., 2001; Avila et al., 2004; Berger et al., 2007; Delacourte, 2006; Sato et al., 2002). Among the different kinases known to phosphorylate tau, the proline-directed serine/threonine kinases, Cdk5 and GSK-3, have been identified as prime candidates mediating aberrant tau phosphorylation (Plattner et al., 2006). In a first set of experiments we focused our attention on Cdk5 over GSK-3 because increased expression and activity of Cdk5, but not that of GSK-3 β , has been demonstrated in 5-month-old SAMP8 mice in comparison with age-matched SAMR1 (Canudas et al., 2005). Although we did not find a significant increase in the expression of Cdk5 in SAMP8 versus SAMR1 mice, we found a significant increase in the p25/p35 ratio in the hippocampus of 6-month-old SAMP8 mice as compared with SAMR1 mice, which is consistent with the data previously reported by Canudas et al. (2005). Noteworthy, these animals also showed an increased phosphorylation of tau at Ser202/Ser205 (AT8 epitope), further supporting the key

role of deregulated kinase activity through the Cdk5/p25 complex (Ahlijanian et al., 2000; Dahavan and Tsai, 2001; Hamdane et al., 2003; Patrick et al., 1999; Takashima et al., 2001). Treatment with sildenafil caused a significant reduction in these biochemical parameters and improved learning and memory deficits shown by SAMP8 mice. Thus, sildenafil decreased Cdk5 protein levels and activity (p25/p35 ratio) and reduced AT8 immunoreactivity in SAMP8 mice further supporting a causal link between biochemical abnormalities and behavioral deficits. p35 proteolysis into p25 occurs in response to diverse insults that trigger calpain activation (Kusakawa et al., 2000; Lee et al., 2001; Nath et al., 2000). We have previously demonstrated that sildenafil, and other PDE5 inhibitors, afford neuroprotection against nitropropionic acid-induced excitotoxicity by blocking calpain activation (Puerta et al., 2010). Accordingly, although not directly tested in this study, it appears conceivable to suggest that the beneficial effects afforded by sildenafil could be mediated, at least in part, by a reduction in calpain activity.

In tandem with Cdk5, GSK-3 β regulates tau phosphorylation (Avila et al., 2004), and several reports have described crosstalk between these 2 kinases (Augustinack et al., 2002; Plattner et al., 2006). For this reason, we also analyzed GSK-3 β levels at 6 months of age but failed to find any difference in SAMP8 in comparison with age-matched SAMR1. These results are in agreement with those reported earlier in this mouse model (Canudas et al., 2005), and also with the finding that at 6 months of age no significant differences were noticeable in tau hyperphosphorylation using PHF-1 antibody, which is directed against a doubly phosphorylated tau epitope (Ser396/Ser404), exactly where GSK-3 β shows its highest phosphorylating activity (Augustinack et al., 2002).

An elegant study recently published by Del Valle et al. (2010), evaluated the time course deposition of amyloid- β (A β) in the hippocampus of SAMP8 mice. In this study, the authors showed that from as early as 6 months onward, SAMP8 mice show A β deposition in the hippocampus that increases in number and extent with age. Taking this into account, we also analyzed tau phosphorylation in 9-month-old SAMP8 and SAMR1 mice. In addition to what we found in the hippocampus of 6-month-old mice, older mice showed an increased immunoreactivity not only to AT8 but also to PHF-1 antibody. As described above, tau hyperphosphorylation at Ser396/Ser404 (PHF-1 epitope) denoted an increase in paired helical filament formation, pointing to a pronounced activity of not only of Cdk5 but also of GSK-3 β in aged mice. The explanation for the differences found at 6 and 9 months of age may

rely in the findings reported by Plattner et al. (2006). These authors observed that Cdk5 overactivation leads to inhibition of GSK-3, such inhibition, however, is lost in old animals which results in increased GSK-3 activity, coinciding with tau hyperphosphorylation at both, AT8 and PHF-1 sites. Noteworthy, sildenafil administration to old SAMP8 mice not only led to a reduction of the age-dependent increase in tau hyperphosphorylation (both AT8 and PHF-1 epitopes) but it also reversed the age-associated learning and memory impairments found in 9-month-old SAMP8 compared with age-matched SAMR1.

A broad amount of evidence indicates that GSK-3 β is a downstream target for Akt and its phosphorylation at Ser9 inhibits its kinase activity (Cross et al., 1995). In agreement with previous studies (Puerta et al., 2009; Wang et al., 2005), our data show that sildenafil increased phosphorylated Akt, which was associated with increases of phosphorylated GSK-3 β both in SAMP8 and SAMR1 providing a plausible explanation to the reductions in PHF-1 immunoreactivity and also to the benefits provided by sildenafil against cognitive deficits shown by 9-month-old SAMP8 mice. This contention is further supported by recent reports demonstrating the beneficial effects of reducing tau hyperphosphorylation to ameliorate cognitive deficits in AD transgenic mice (Corcoran et al., 2010; Green et al., 2008; Ricobaraza et al., 2009; Roberson et al., 2007).

Finally, we would also like to note that reduction of tau hyperphosphorylation might be 1 of many mechanisms contributing to attenuating cognitive impairments in SAMP8 mice. Of interest, we have shown that sildenafil activates cyclic adenosine monophosphate response element-binding (CREB) signaling pathway and its downstream gene, brain derived neurotrophic factor (BDNF; Puerta et al., 2010), both of which are decreased in the hippocampus of SAMP8 mice (Shi et al., 2010; Tajés et al., 2010), and restoring their levels improves learning and memory outcomes in SAMP8 mice (Shi et al., 2010). The administration of different antioxidants to SAMP8 also improves the cognitive deficits observed in these mice (Butterfield et al., 1997; Farr et al., 2003; Okatani et al., 2002; Poon et al., 2005; Yasui et al., 2002), and sildenafil increases manganese superoxide dismutase (unpublished data). Other factors such as abnormal expression of A β appear to contribute to the cognitive decline in the aged SAMP8 mice as well. Thus, administration of A β antibodies or antisense oligonucleotides that lower amyloid precursor protein (APP) messenger ribonucleic acid (mRNA) improve their cognitive deficits (Kumar et al., 2000; Morley et al., 2000, 2002; Poon et al., 2004), and sildenafil is known to reduce A β levels in an AD mouse model (Puzzo et al.,

2009). The possible contribution of any of these mechanisms to the therapeutic effects shown by sildenafil in SAMP8 mice is the focus of ongoing studies in our laboratory.

In conclusion, our results provide further support for the beneficial effect of sildenafil in brain dysfunction related to the aging period. Overall, due to its potential therapeutic profile, sildenafil could be an emerging candidate for the treatment of other neurodegenerative diseases such as AD and other tauopathies.

Disclosure statement

The authors report no conflict of interest, including financial or personal. All the procedures followed in this work were in compliance with the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and were approved by the Ethical Committee of the University of Navarra.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-05143-C03-01) to J.J. and (SAF2008-05143-C03-03) to N.A.

References

- Ahlijanian** MK, Barrezueta NX, Williams RD, Jakowski A, Kowsz KP, McCarthy S, Coskran T, Carlo A, Seymour PA, Burkhardt JE, Nelson RB, McNeish JD (2000) Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2910–2915.
- Alonso** A, Zaidi T, Novac M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6923–6928.
- Arriagada** PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**, 631–639.
- Ashe** KH, Zahs KR (2010) Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* **66**, 631–645.
- Augustinack** JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT (2002) Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **103**, 26–35.
- Avila** J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of Tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* **84**, 361–384.
- Bancher** C, Braak H, Fischer P, Jellinger KA (1993) Neuropathological staging of Alzheimer lesions and intellectual status in Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* **162**, 179–182.
- Baratti** CM, Boccia MM (1999) Effects of sildenafil on long-term retention of an inhibitory avoidance response in mice. *Behav Pharmacol* **10**, 731–737.
- Barzilai** N, Atzmon G, Derby CA, Bauman JM, Lipton RB (2006) A genotype of exceptional longevity is associated with preservation of cognitive function. *Neurology* **67**, 2170–2175.
- Berger** Z, Roder H, Hanna A, Carlson A, Rangachari V, Yue M, Wszolek Z, Ashe K, Knight J, Dickson D, Andorfer C, Rosenberry TL, Lewis J, Hutton M, Janus C (2007) Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J Neurosci* **27**, 3650–3662.

- Butterfield DA**, Howard BJ, Yatin S, Allen KL, Carney JM (1997) Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 674–678.
- Canudas AM**, Gutierrez-Cuesta J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallàs M (2005) Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* **126**, 1300–1304.
- Corcoran NM**, Martin D, Hutter-Paier B, Windisch M, Nguyen T, Nheu L, Sundstrom LE, Costello AJ, Hovens CM (2010) Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model. *J Clin Neurosci* **17**, 1025–1033.
- Cross DA**, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785–789.
- Dahavan R**, Tsai LH (2001) A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 749–759.
- Del Valle J**, Duran-Vilaregut J, Manich G, Casadesús G, Smith MA, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J (2010) Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis* **19**, 1303–1315.
- Delacourte A** (2006) The natural and molecular history of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **9**, 187–194.
- Devan BD**, Bowker JL, Duffy KB, Bharati IS, Jimenez M, Sierra- Mercado D, Jr Nelson CM, Spangler EL, Ingram DK (2006) Phosphodiesterase inhibition by sildenafil citrate attenuates a maze learning impairment in rats induced by nitric oxide synthase inhibition. *Psychopharmacology* **183**, 439–445.
- Devan BD**, Pistell PJ, Daffin LW, Jr Nelson CM, Duffy KB, Bowker JL, Bharati IS, Sierra-Mercado D, Spangler EL, Ingram DK (2007) Sildenafil citrate attenuates a complex maze impairment induced by intracerebroventricular infusion of the NOS inhibitor Nomega-nitro-L-arginine methyl ester. *Eur J Pharmacol* **563**, 134–140.

- Devan** BD, Sierra-Mercado D, Jr Jimenez M, Bowker JL, Duffy KB, Spangler EL, Ingram DK (2004) Phosphodiesterase inhibition by sildenafil citrate attenuates the learning impairment induced by blockade of cholinergic muscarinic receptors in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **79**, 691–699.
- Ding** G, Jiang Q, Li L, Zhang L, Zhang ZG, Ledbetter KA, Panda S, Davarani SP, Athiraman H, Li Q, Ewing JR, Chopp M (2008) Magnetic resonance imaging investigation of axonal remodelling and angiogenesis after embolic stroke in sildenafil-treated rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 1440–1448.
- Farr** SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyerman E, Butterfield DA, Morley JE (2003) The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J Neurochem* **84**, 1173–1183.
- García-Matas** S, Gutierrez-Cuesta J, Coto-Montes A, Rubio-Acero R, Díez-Vives C, Camins A, Pallàs M, Sanfeliu C, Cristòfol R (2008) Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Aging Cell* **7**, 630–640.
- Gerlai** R, (2001) Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. *Behav Brain Res* **125**, 269–277.
- Goñi-Allo** B, Puerta E, Ramos M, Lasheras B, Jordán J, Aguirre N (2008) Minoxidil prevents 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin depletions: role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels, Akt and ERK. *J Neurochem* **104**, 914–925.
- Green** KN, Steffan JS, Martinez-Coria H, Sun X, Schreiber SS, Thompson LM, LaFerla FM (2008) Nicotinamide restores cognition in Alzheimer's disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phospho tau. *J Neurosci* **5**, 11500–11510.
- Guillozet** AL, Weintraub S, Mash DC, Mesulam MM (2003) Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol* **60**, 729–736.
- Hamamoto** H, Honma A, Irino M, Matsushita T, Toda K, Matsumura M, Takeda T (1984) Grading score system: A method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* **26**, 91–102.

- Hamdane M**, Sambo AV, Delobel P, Bégard S, Violleau A, Delacourte A, Bertrand, P, Benavides J, Buée L (2003) Mitotic-like tau phosphorylation by p25-Cdk5 kinase complex. *J Biol Chem* **278**, 34026–34034.
- Kumar VB**, Farr SA, Flood JF, Kamlesh V, Franko M, Banks WA, Morley JE (2000) Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides* **21**, 1769–1775.
- Kusakawa G**, Saito T, Ohuki R, Ishiguro K, Kishimoto T, Hisanaga S (2000) Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclindependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem* **275**, 17166–17172.
- Lee VM**, Goedert M, Trojanowski JQ (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* **24**, 1121–1159.
- Liu W**, Liu C, Zhu J, Shu P, Yin B, Gong Y, Qiang B, Yuan J, Peng X (2012) MicroRNA-16 targets amyloid precursor protein to potentially modulate Alzheimer's-associated pathogenesis in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging*. **33**, 522-534.
- Maccioni RB**, Cambiazo V (1995) Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* **75**, 835–864.
- Mehta PD** (2007) Amyloid beta protein as a marker or risk factor of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **4**, 359–363.
- Morley JE**, Farr SA, Flood JF (2002) Antibody to amyloid beta protein alleviates impaired acquisition, retention, and memory processing in SAMP8 mice. *Neurobiol Learn Mem* **78**, 125–138.
- Morley JE**, Kumar VB, Bernardo AE, Farr SA, Uezu K, Tumosa N, Flood JF (2000) Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides* **21**, 1761–1767.
- Mostafa T** (2008) Oral phosphodiesterase type 5 inhibitors: nonerectogenic beneficial uses. *J Sex Med* **5**, 2502–2518.
- Nath R**, Davis M, Probert AW, Kupina NC, Ren X, Schielke GP, Wang KK (2000) Processing of cdk5 activator p35 to its truncated form (p25) by calpain in acutely injured neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 16–21.

- Okatani** Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y (2002) Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescenceaccelerated mouse. *Neurobiol Aging* **23**, 639–644.
- Pallas** M, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesus G (2008) From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis* **15**, 615–624.
- Patil** CS, Singh VP, Kulkarni SK (2006) Modulatory effect of sildenafil in diabetes and electroconvulsive shock-induced cognitive dysfunction in rats. *Pharmacol Rep* **58**, 373–380.
- Patrick** GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**, 615–622.
- Plattner** F, Angelo M, Giese, KP (2006) The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem* **281**, 25457–25465.
- Poon** HF, Farr SA, Thongboonkerd V, Lynn BC, Banks WA, Morley JE, Klein JB, Butterfield DA (2005) Proteomic analysis of specific brain proteins in aged SAMP8 mice treated with alpha-lipoic acid: implications for aging and age-related neurodegenerative disorders. *Neurochem Int* **46**, 159–168.
- Poon** HF, Joshi G, Sultana R, Farr SA, Banks WA, Morley JE, Calabrese V, Butterfield DA (2004) Antisense directed at the Abeta region of APP decreases brain oxidative markers in aged senescence accelerated mice. *Brain Res* **1018**, 86–96.
- Prickaerts** J, de Vente J, Honig W, Steinbusch HW, Blokland A (2002) cGMP, but not cAMP, in rat hippocampus is involved in early stages of object memory consolidation. *Eur J Pharmacol* **436**, 83–87.
- Puerta** E, Hervias I, Barros-Miñones L, Jordan J, Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, García-Osta A, Aguirre N (2010) Sildenafil protects against 3-nitropropionic acid neurotoxicity through the modulation of calpain, CREB, and BDNF. *Neurobiol Dis* **38**, 237–245.
- Puerta** E, Hervias I, Goñi-Allo B, Lasheras B, Jordan J, Aguirre N (2009) Phosphodiesterase 5 inhibitors prevent 3,4-methylenedioxymethamphetamine- induced 5-HT deficits in the rat. *J Neurochem* **108**, 755–766.

- Puzzo D**, Staniszewski A, Deng SX, Privitera L, Leznik E, Liu S, Zhang H, Feng Y, Palmeri A, Landry DW, Arancio O (2009) Phosphodiesterase 5 inhibition improves synaptic function, memory, and amyloid-beta load in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci* **29**, 8075–8086.
- Reagan-Shaw S**, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* **22**, 659–661.
- Ricobaraza A**, Cuadrado-Tejedor M, Pérez-Mediavilla A, Frechilla D, Del Río J, García-Osta A (2009) Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacology* **34**, 1721–1732.
- Roberson ED**, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L, (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* **316**, 750–754.
- Rutten K**, Vente JD, Sik A, Ittersum MM, Prickaerts J, Blokland A (2005) The selective PDE5 inhibitor, sildenafil, improves object memory in Swiss mice and increases cGMP levels in hippocampal slices. *Behav Brain Res* **164**, 11–16.
- Sato S**, Tatebayashi Y, Akagi T, Chui DH, Murayama M, Miyasaka T, Planel E, Tanemura K, Sun X, Hashikawa T, Yoshioka K, Ishiguro K, Takashima A (2002) Aberrant tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta and JNK3 induces oligomeric tau fibrils in COS-7 cells. *J Biol Chem* **277**, 42060–42065.
- Shi YQ**, Huang TW, Chen LM, Pan XD, Zhang J, Zhu YG, Chen XC (2010) Ginsenoside Rg1 attenuates amyloid-beta content, regulates PKA/CREB activity, and improves cognitive performance in SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis* **19**, 977–989.
- Sureda FX**, Gutierrez-Cuesta J, Romeu M, Mulero M, Canudas AM, Camins A, Mallol J, Pallàs M, (2006) Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Exp Gerontol* **41**, 360–367.
- Tajes M**, Gutierrez-Cuesta J, Folch J, Ortuño-Sahagun D, Verdaguer E, Jiménez A, Junyent F, Lau A, Camins A, Pallàs M (2010) Neuroprotective role of intermittent fasting in senescence-accelerated mice P8 (SAMP8). *Exp Gerontol* **45**, 702–710.

- Takashima A**, Murayama M, Yazutake K, Takahashi H, Yokoyama M, Ishiguro K (2001) Involvement of cyclin dependent kinase5 activator p25 on tau phosphorylation in mouse brain. *Neurosci Lett* **306**, 37–40
- Takeda T** (1999) Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiol Aging* **20**, 105–110.
- Takeda T**, Hosokawa M, Higuchi K (1994) Senescence accelerated mouse (SAM), a novel murine model of aging. In: *Takeda, T. (Ed.). The SAM Model of Senescence* Elsevier, Amsterdam, pp. 15–22.
- Takeda T**, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T (1981) A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* **17**, 183–194.
- Timmer NM**, van Dijk L, van der Zee CE, Kiliaan A, de Waal RM, Verbeek MM (2010) Enoxaparin treatment administered at both early and late stages of amyloid beta deposition improves cognition of APP^{swe}/PS1^{dE9} mice with differential effects on brain A beta levels. *Neurobiol Dis* **40**, 340–347.
- Tomobe K**, Nomura Y (2009) Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence. *Neurochem Res* **34**, 660–669.
- Wang L**, Gang Zhang Z, Lan Zhang R, Chopp M (2005) Activation of the PI3-K/Akt pathway mediates cGMP enhanced-neurogenesis in the adult progenitor cells derived from the subventricular zone. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 1150–1158.
- Yasui F**, Matsugo S, Ishibashi M, Kajita T, Ezashi Y, Oomura Y, Kojo S, Sasaki K (2002) Effects of chronic acetyl-L-carnitine treatment on brain lipid hydroperoxide level and passive avoidance learning in senescence-accelerated mice. *Neurosci Lett* **334**, 177–180.
- Zhang L**, Zhang RL, Wang Y, Zhang C, Zhang ZG, Meng H, Chopp M (2005) Functional recovery in aged and young rats after embolic stroke: treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Stroke* **36**, 847–852.

CAPÍTULO IV

Chapter 4

Sildenafil decreases BACE1 and Cathepsin B levels and reduces APP amyloidogenic processing in the SAMP8 mouse

Lourdes Orejana, Lucía Barros-Miñones, Joaquin Jordan, Angel Cedazo-
Minguez, Norberto Aguirre, Elena Puerta.

Submitted, 2012

Sildenafil decreases BACE1 and Cathepsin B levels and reduces APP amyloidogenic processing in the SAMP8 mouse

Lourdes Orejana, Lucía Barros-Miñones, Joaquin Jordan, Angel Cedazo-Minguez, Norberto Aguirre, Elena Puerta.

Orejana L, Barros-Miñones L, Puerta E, et al. Sildenafil Decreases BACE1 and Cathepsin B Levels and Reduces APP Amyloidogenic Processing in the SAMP8 Mouse. [*The Journals Of Gerontology. Series A, Biological Sciences And Medical Sciences*](#) [serial online]. July 25, 2014

CAPÍTULO V

Chapter 5

Implication of JNK pathway on tau pathology and cognitive decline in a senescence-accelerated mouse model

Lourdes Orejana, Lucía Barros-Miñones, Joaquín Jordán, Elena Puerta,
Norberto Aguirre

Resumen

El ratón de senescencia acelerada (SAMP8) es un modelo experimental de envejecimiento acelerado que comparte, además, ciertas características patológicas con la enfermedad de Alzheimer. De todas ellas, el déficit cognitivo y la fosforilación anómala de tau mejoran con la administración del inhibidor de la fosfodiesterasa 5 sildenafil, posiblemente a través de la modulación de las vías Cdk5/p25 y Akt/GSK-3 β . En el presente trabajo estudiamos si la cinasa N-terminal de c-Jun (JNK) podría también participar en el efecto terapéutico del sildenafil. Los resultados demuestran que el mismo tratamiento con sildenafil que revierte el declive cognitivo y la hiperfosforilación de tau en este modelo animal (7.5 mg/kg i.p. durante 4 semanas), también logró revertir el aumento de la activación de JNK (p-JNK) observado en el hipocampo de los ratones SAMP8 de 6 meses de edad en comparación con la cepa control SAMR1 de la misma edad. Por otro lado, la administración del inhibidor de JNK, D-JNKI-1 (0.2 mg/kg i.p. durante 3 semanas) también produjo una mejora de déficit cognitivo que mostraron los ratones SAMP8 en el Laberinto Acuático de Morris y una reducción de los niveles de fosfo-c-Jun(ser73) en el hipocampo de estos ratones. Al analizar los niveles de la proteína tau fosforilada (epítipo AT8), se observó una reducción significativa en el hipocampo de los ratones SAMP8 tratados con D-JNKI-1, lo que podría explicar la mejora del déficit cognitivo que mostraron estos animales. Estos resultados sugieren la implicación de la vía JNK en la patología tau y en el déficit cognitivo que presentan los ratones SAMP8 de 6 meses de edad. Además, los resultados en su conjunto señalan que la modulación de esta cinasa podría ser uno de los mecanismos responsables del efecto terapéutico observado en estos ratones tras la administración de sildenafil.

Abstract

The senescence accelerated mouse-prone 8 (SAMP8) strain of mice is an experimental model of accelerated senescence that also shares several pathological features with Alzheimer's disease. Among them, cognitive impairments and abnormal hyperphosphorylation of tau are ameliorated by the phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil, possibly through the modulation of Cdk5/p25 and Akt/GSK-3 β pathways. Here we studied whether c-Jun N-terminal kinase (JNK) also participates in the therapeutic effects of sildenafil. Results demonstrated that the same treatment of sildenafil that has been shown to reverse the cognitive impairment and tau hyperphosphorylation in this animal model (7.5 mg/kg i.p. for 4 weeks), also reversed the increased levels of activated JNK (p-JNK) found in the hippocampus of 6-month old SAMP8 mice when compared to age-matched control, SAMR1 mice. Moreover, the administration of the JNK inhibitor, D-JNKI-1 (0.2 mg/kg for 3 weeks) also ameliorated the cognitive deficits shown by SAMP8 mice in the Morris water maze and decreased hippocampal levels of phospho-c-Jun(Ser73). When phosphorylated tau (AT8 epitope) was analyzed a significant reduction was observed in the hippocampus of D-JNKI-1 treated SAMP8 mice, providing a plausible explanation for the attenuation of cognitive decline shown by these animals. These findings suggest the involvement of the JNK pathway on tau pathology and cognitive deficits shown by 6-month old SAMP8 mice. They also point to the modulation of this kinase to be among the mechanisms responsible for the beneficial effects shown by sildenafil.

Keywords: Alzheimer's disease; D-JNKI-1; c-Jun N-terminal kinase (JNK); SAMP8; sildenafil; Tau.

1. Introduction

Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative disorder affecting millions of people worldwide and is the main cause of dementia in the elderly (Hardy and Selkoe, 2002). Brains of AD patients are neuropathologically characterized by the presence of amyloid plaques and neurofibrillary tangles (NFT). These NFTs are aggregates of paired helical filaments (PHF) mainly consisting of the hyperphosphorylated form of the microtubule-associated tau protein (Kosik, 1990). Hyperphosphorylation of tau has been extensively linked to neurodegeneration (Ashe, 2007; Lee and Trojanowski, 2001), and it involves a wide range of kinases including glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β), cyclin-dependent kinase (Cdk5) and c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) (Buee-Scherrer and Goedert, 2002; Kobayashi et al., 1993; Mandelkow et al., 1992; Reynolds et al., 1997).

JNK belongs to the family of serine and threonine mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and is involved in numerous cellular processes, such as proliferation, differentiation, development, inflammation, and apoptosis (Weston and Davis, 2007). It is well known that its activation leads to the phosphorylation of tau at S202/T205 (recognized by the AT8 antibody) (Ploia et al., 2011; Yoshida et al., 2004), and correlates with AD progression (Sato et al., 2002; Shoji et al., 2000; Zhu et al., 2001a; 2001b). In fact, among the kinases responsible for tau phosphorylation, JNK is particularly interesting, since increased levels of JNK have been observed in AD brains and its activated form (p-JNK) co-localizes with p-tau in neurons of AD patients (Mohit et al., 1995; Zhu et al., 2001b).

The senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) has been proposed as one plausible age-associated AD animal model (Liu et al., 2012; Pallas et al., 2008), and a suitable rodent model for studying the molecular mechanisms underlying cognitive impairment in aged subjects (Tomobe and Nomura, 2009). Among other changes, SAMP8 mice exhibit age-related learning and memory deficits, as well as amyloid-like deposits in the brain (del Valle et al., 2010; Tomobe and Nomura, 2009) and increased expression of hyperphosphorylated tau (Canudas et al., 2005). Although several studies have provided insight into the involvement of Cdk5 and GSK-3 β (Canudas et al., 2005; Orejana et al., 2012; Tajés et al., 2008), and increased levels of p-JNK have been observed in the cortex of 3-month old SAMP8 mice (Tajés et al., 2010), little is known about the contribution of JNK to tau hyperphosphorylation and the cognitive decline that these mice manifest at early ages.

A previous study from our group has demonstrated that the phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitor sildenafil ameliorates the cognitive decline and tau pathology in 6-month old SAMP8 mice (Orejana et al., 2012). Interestingly, sildenafil has been shown to decrease JNK phosphorylation in vitro (Zhao et al., 2011), therefore, the present study was designed to analyze the implication of JNK in the beneficial effects observed in sildenafil-treated SAMP8 animals and the role of this kinase in the cognitive impairment and tau phosphorylation shown by 6-month old SAMP8 mice. For this purpose we administered D-JNKI-1, the most specific JNK inhibitor peptide (Borsello et al., 2003), to SAMP8 and aged matched control mice, senescence accelerated mouse resistant 1 (SAMR1), and investigated the effect of JNK inhibition in this animal model.

2. Experimental procedures

2.1. Drugs and Chemicals

1-[4-ethoxy-3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1Hpyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)phenylsulfonyl]-4-methylpiperazine citrate was from Pfizer (Sildenafil citrate, Viagra™; New York, NY, USA). The D-JNKI-1 peptide (BML-EI355) was purchased from Enzo Life Sciences International, Inc. (Farmingdale, NY); all other chemicals were from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Animals, treatments, and experimental design

Experiments were carried out in male SAMP8 (28–30 g) and SAMR1 mice (32–35 g) obtained from Harlan (Harlan Iberica, Barcelona, Spain). Animals were housed (5 per cage) in constant conditions of humidity and temperature (22 ± 1 °C) with a 12-hour/12-hour light-dark cycle (lights on at 7:00 hours). Food and water were available *ad libitum*. All the procedures followed in this work were in compliance with the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and were approved by the Ethical Committee of the University of Navarra.

To study the effect of sildenafil on JNK activity, 5-month old male SAMP8 and SAMR1 mice were treated once daily with sildenafil (7.5 mg/kg intraperitoneally [i.p.]) or saline for 4 consecutive weeks. The dose of sildenafil was chosen to simulate the dose for a patient of 80 kg body weight after taking a 50-mg tablet of Viagra™ according to Reagan-Shaw et al. (2008), and is the same treatment that has been shown to reverse memory impairments and

tau hyperphosphorylation in 6 month-old SAMP8 mice (Orejana et al., 2012). The last injection was administered 3 hours before the mice were killed. Solutions of sildenafil were prepared by grinding Viagra™ tablets into powder and dissolved in saline. The drug solutions were filtered (22 µm pore size) before administration.

To study the involvement of JNK on the cognitive impairment shown by 6-month-old male SAMP8 mice, animals were treated once daily with the JNK inhibitor D-JNKI-1 (0.2 mg/kg i.p.) or saline for 3 consecutive weeks. Drug administration started 2 weeks before the beginning of the Morris water maze test (MWM) and extended throughout the duration of the behavioural test (9 days). During these days, D-JNKI-1 was given at the end of the session. The last injection was administered 3 hours before the mice were killed. Solutions of D-JNKI-1 were prepared by diluting 1 mg JNK inhibitor powder in 50 ml of saline solution. Aliquots of this solution were frozen at -20°C until utilization.

2.3. Morris water maze test (MWM)

The MWM, a hippocampus-dependent learning task, was used to test spatial memory and to evaluate the working and reference memory function in response to treatment with D-JNKI-1 in SAMP8 and SAMR1 mice, as previously described (Ricobaraza et al., 2009).

The water maze was a circular pool (diameter of 145 cm) filled with water (21-22°C) and virtually divided into four equal quadrants identified as northeast, northwest, southeast, and southwest. Mice underwent visible-platform training for 3 consecutive days (8 trials/day) in which a platform was located in the southwest quadrant raised above the water. Mice that were unable to reach the platform, exhibiting abnormal swimming patterns or persistent floating were excluded from data analyses.

Hidden-platform training was conducted with the platform placed in the northeast quadrant 1 cm below the water surface over 9 consecutive days (4 trials/day). Several large visual cues were placed in the room to guide the mice to the hidden platform. Each trial was finished when the mouse reached the platform (escape latency) or after 60 s, whichever came first. Mice failing to reach the platform were guided onto it. After each trial mice remained on the platform for 15 s.

To test memory retention, three probe trials were performed at the beginning of the 4th, 7th, and the last day of the test (day 9). In the probe trials the platform was removed from

the pool and mice were allowed to swim for 60 seconds. The percent of time spent in the target quadrant was recorded. All trials were monitored by a video camera set above the center of the pool and connected to a video tracking system (Ethovision 3.0; Noldus Information Technology B.V, Wageningen, Netherlands).

2.4. Western blot analysis

Western blot analysis was carried out in hippocampal tissues collected from mice killed 3 hours after the last administration of D-JNKI-1 or sildenafil. Tissue homogenates were obtained as described elsewhere (Goñi-Allo et al., 2008). Proteins (20 mg) were separated by electrophoresis on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (10%) under reducing conditions. Membranes were probed overnight at 4°C with the following primary antibodies: rabbit monoclonal antiphospho- c-jun (ser 73) [D47G9; 1:1000 Cell Signalling Technology Beverly, MA, USA]; rabbit monoclonal anti c-jun [60A8 1:1000 Cell Signalling Technology Beverly, MA, USA]; rabbit monoclonal anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)[1:500 Cell Signalling Technology Beverly, MA, USA]; rabbit monoclonal anti-SAPK/JNK (56G8)[1:500 Cell Signalling Technology Beverly, MA, USA]; mouse monoclonal anti-p-tau AT8 (1:5000 Pierce Biotechnology, Inc, Rockford, IL, USA); mouse monoclonal anti tau clone Tau46 and mouse monoclonal anti-actin (1:1000 and 1:15,000 respectively, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence (ECL™) western blotting detection reagent (Amersham, Buckinghamshire, England) and band intensity was estimated densitometrically on a GS-800 calibrated densitometer (Biorad One, Madrid, Spain).

2.5. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). In the acquisition phase of the MWM, treatment effects were analyzed by 2-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures followed by Tukey post hoc test and time spent in the target quadrant on the probe trial was analyzed using 2-way ANOVA (strain*treatment) followed by Tukey post hoc test. Neurochemical data was analyzed using Student's t test or one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. In results section, the F values concerning the behavioural data represent the F of interaction followed by the p-value of the corresponding post hoc test. In those cases where the F of interaction was not statistically significant the F value represents the main effect observed strain or treatment. Treatment differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Data analyses were performed using the

Statistical Program for the Social Sciences (SPSS for Windows, 15.0; SPSS, Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Sildenafil reduces JNK activity and c-Jun phosphorylation in 6-month old SAMP8 mice.

First of all, levels of activated JNK (p-JNK) were measured in the hippocampus of both 6-month old SAMR1 and SAMP8 animals. As depicted in Fig. 1A, an increase of p-JNK was observed in SAMP8 strain of mice in comparison with SAMR1 animals [$F=32.603$, $p<0.01$]. Interestingly, when levels of p-JNK in sildenafil-treated animals were measured, a decreased of JNK activation was observed in both SAMP8 ($p<0.01$) and SAMR1 animals ($p<0.05$). In accordance with these results, SAMP8 animals also showed higher levels of p-c-Jun(ser73) in comparison to control strain SAMR1 [$F=4.973$, $p<0.05$]. Treatment with sildenafil resulted in a significant reduction of c-Jun phosphorylation in SAMP8 mice ($p<0.05$) (Fig. 1B). No differences were observed in total JNK or c-Jun protein levels among the groups.

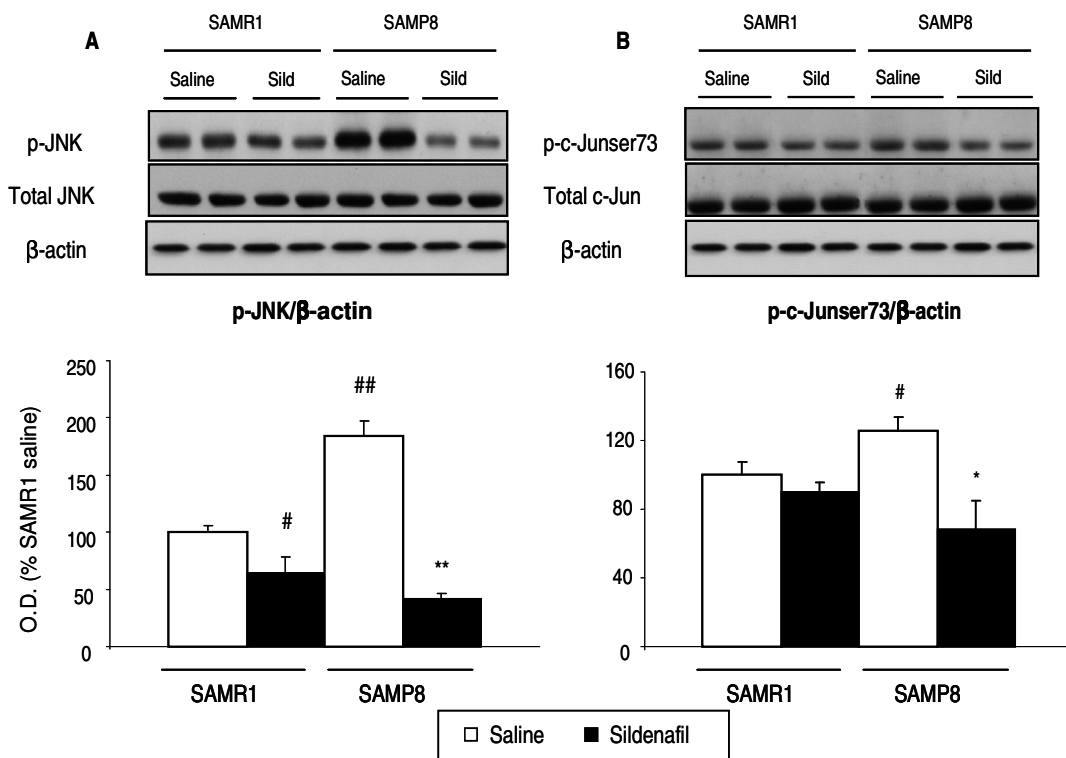


Figure 1. Effect of sildenafil on JNK and c-Jun in SAMP8 and SAMR1 mice. Sildenafil (7.5 mg/kg i.p.) was administered every 24 hours for 4 weeks to 5-month old SAMP8 and SAMR1 mice. Mice were killed 3 h after the last saline or sildenafil injection. (A) Representative Western blot showing hippocampal activated/phosphorylated JNK (46 KDa), and total JNK levels in 6-month old SAMP8 and SAMR1 mice. (B) Western blot analysis of phosphorylated c-Jun(ser73) levels (43-48 KDa) normalized to β-actin. Results are expressed as mean±S.E.M. (n=8). # $p<0.05$ vs. SAMR1-saline, ## $p<0.01$ vs. SAMR1-saline, * $p<0.05$ vs SAMP8-saline ** $p<0.01$ vs SAMP8-saline. One-way ANOVA followed Tukey's test.

3.2. Effect of D-JNKI-1 on spatial learning and memory in SAMP8 mice

In order to analyze the implication of JNK in the beneficial effects observed in SAMP8 animals treated with sildenafil (Orejana et al., 2012) we next administered the JNK inhibitor, D-JNKI-1, to 5-month old SAMP8 and SAMR1 mice and investigated the effect of JNK inhibition in the cognitive decline observed in SAMP8 animals at this age in the Morris Water Maze.

We first analysed the swim speed of the animals on the first trial of the first session in the hidden platform training before subjects from any group knew the location of the platform. There was no difference in swimming speed (data not shown) or sensorimotor function (measured by visible platform trial) among the 4 groups (Fig. 2A), which enabled us to exclude the effect of motivational and sensorimotor factors on animal learning and memory performance. We then used the escape latency for the evaluation of spatial learning and memory of mice.

During the hidden platform trial, escape latencies of SAMP8 mice were longer than those of SAMR1 mice ($F= 8.839$; $p<0.01$; main effect of strain) (Fig. 2B). Moreover, the latencies to find the submerged platform significantly diminished every day in SAMR1 groups, phenomenon that could not be observed in SAMP8 mice, suggesting the existence of learning deficits in these mice. However, on day 8 of the test, D-JNKI-1-treated SAMP8 mice showed significantly shorter escape latencies than SAMP8 saline animals ($p<0.05$), reporting a slight improvement in their behavioural performance. No significant differences were found between saline and D-JNKI-1-treated SAMR1 mice among this phase of the behavioural test.

The probe trial took place at the beginning of the 4th, 7th, and 9th day of the MWM test. In this phase, the platform was removed from the pool and mice swam in the pool for the evaluation of memory retention. As shown in Fig. 2C, the first day of the probe trial, SAMR1 mice spent significantly more time in the target quadrant than SAMP8 mice ($F= 5.387$; $p<0.05$; main effect of strain). Interestingly, on day 9, comparisons between saline and D-JNKI-1 treated groups indicated that SAMP8 mice treated with the inhibitor spent more time in the target quadrant than saline SAMP8 mice ($F =7.469$, $p< 0.05$; main effect of treatment). D-JNKI-1 also improved memory retention in SAMR1 mice.

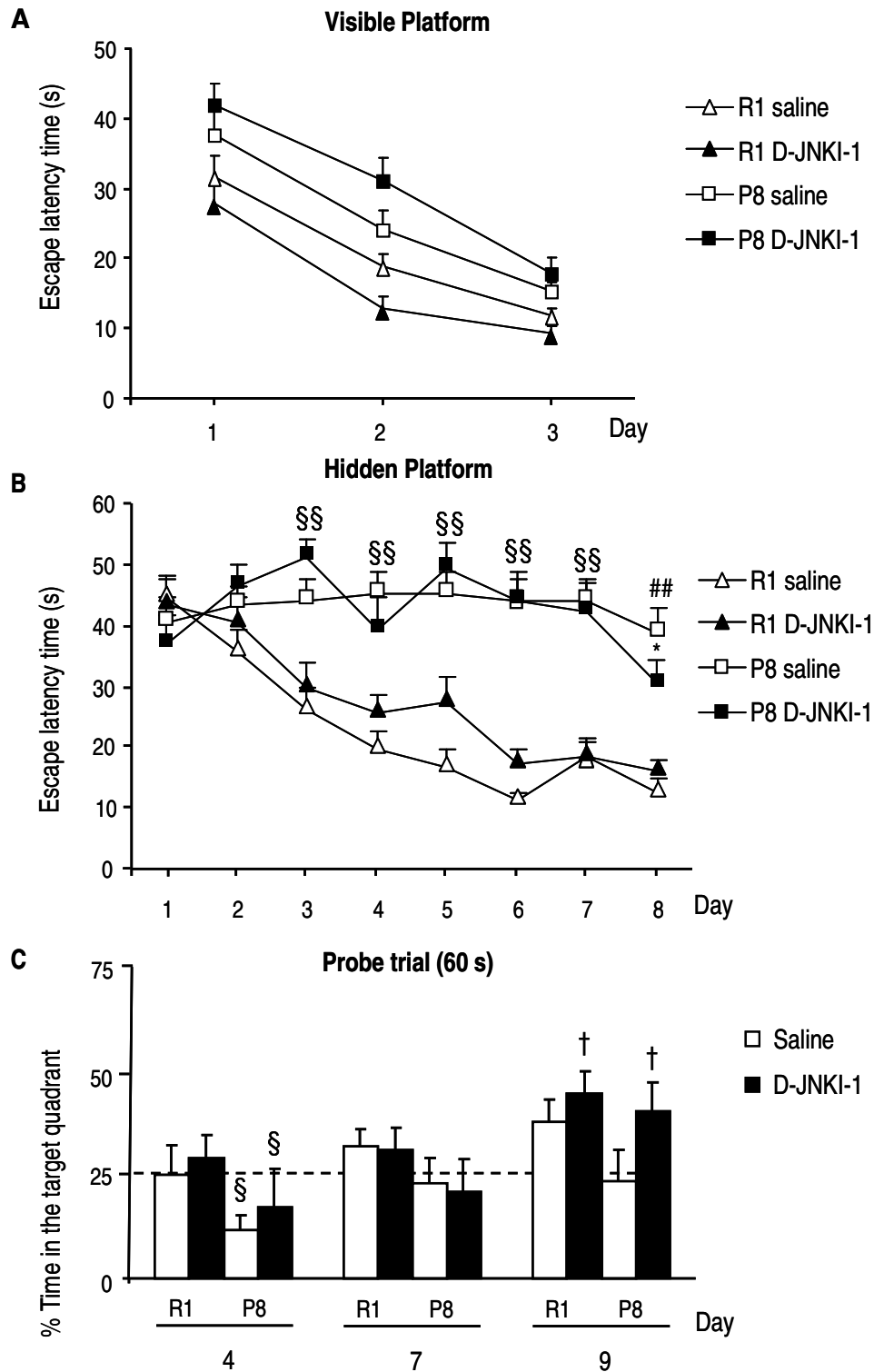


Figure 2. Effect of D-JNKI-1 on the performance of 6-month old SAMP8 and SAMR1 mice in the MWM test. D-JNKI-1 (0.2 mg/kg i.p.) or saline was administered for 3 weeks every 24 hours beginning 2 week before the learning task. (A) Escape latency in the visible platform phase. No significant differences were detected among groups. (B) Escape latency in the hidden platform phase. SAMP8 mice had significant higher escape latency than SAMR1 mice, an effect only significantly reversed by D-JNKI-1 on the last day of the hidden platform. (C) In the probe trial data are presented as percentage of time spent in the target quadrant. A main effect of strain was observed on day 4. On the 9th day D-JNKI-1 administration to SAMP8 and SAMR1 mice significantly increased the time spent in the target quadrant. Results are shown as mean \pm SEM (n = 6-8). ## p<0.01 vs, SAMR1-saline, *p<0.05 vs, SAMP8-saline, §§p<0.01 main effect of strain, §p<0.05 main effect of strain, †p<0.05 main effect of treatment. Two-way ANOVA followed Tukey's test.

3.3. Effect of D-JNKI-1 on tau pathology

To assess the efficiency of D-JNKI-1 to inhibit JNK activity, phosphorylation of c-Jun at Ser 73, a well known target of JNK, was measured. As shown in Fig. 3A, SAMP8 mice have significantly higher hippocampal levels of phospho-c-Jun (Ser 73), an effect reversed by the JNK inhibitor, D-JNKI-1 ($F = 9,594$, $p < 0.05$). As expected, the inhibitor also reduced p-c-Jun levels in SAMR1 treated mice ($p < 0.05$). Noteworthy, levels of p-JNK remained unaltered after D-JNKI-1 treatment (data not shown).

We next tested whether the inhibition of JNK would reverse tau pathology in SAMP8 mice using AT8, a phospho-specific antibody, which recognizes aberrantly phosphorylated tau epitopes on Ser202/Thr205 and which has been demonstrated to be the most appropriated antibody for the measurement of p-JNK-induced tau phosphorylation at early stages of the neurodegeneration process (Ploia et al., 2011). Western blot analysis revealed that hippocampal phosphorylated tau levels normalized to total tau (detected by T46 antibody) were significantly enhanced in SAMP8 mice compared to SAMR1 mice. D-JNKI-1 treatment significantly reduced phosphorylated tau levels in SAMP8 mice [$F = 5.887$, $p < 0.05$] (Fig. 3B).

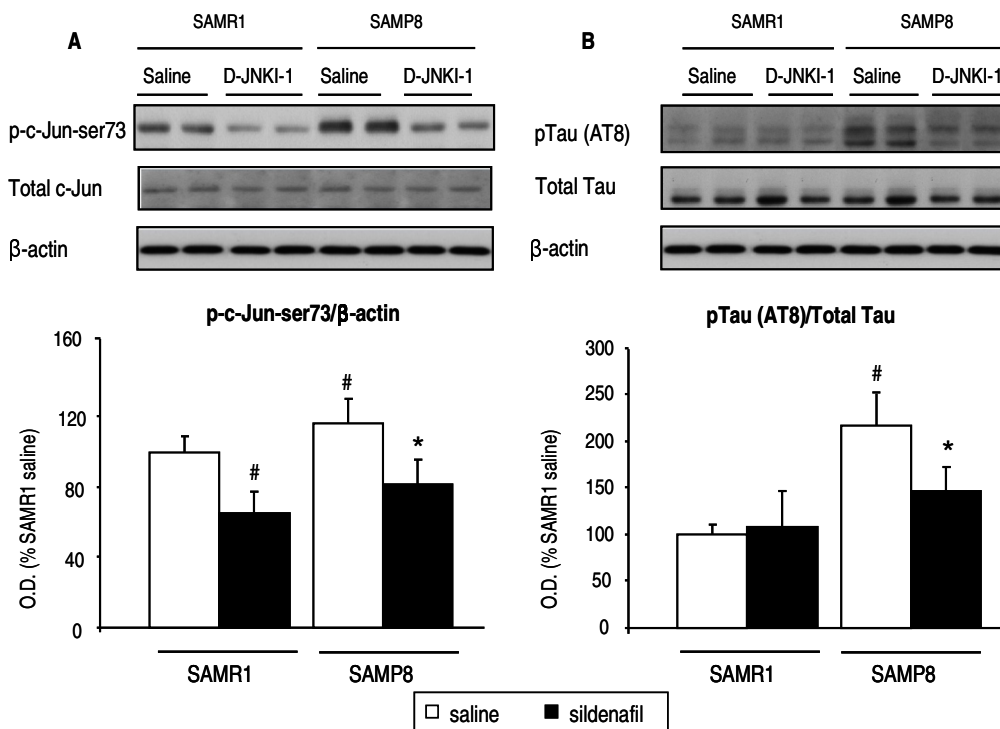


Figure 3. D-JNKI-1 treatment inhibits JNK and decreases tau phosphorylation in SAMP8 mice. D-JNKI-1 (0.2 mg/kg i.p.) was administered every 24 hours for 3 weeks to 5-month old SAMP8 and SAMR1 mice. Mice were killed 3 h after the last saline or D-JNKI-1 injection. (A) Western blots showing p-c-Jun(Ser73) and total c-Jun protein bands (43-48 kDa) in the hippocampus of mice treated with saline or D-JNKI-1. β-actin was used as equal loading control. (B) Representative western blot showing hippocampal phosphorylated Tau (AT8) levels (40-50 kDa) normalized to total Tau. Results are expressed as mean±S.E.M (n=6-8). [#] $p < 0.05$ vs. SAMR1-saline, ^{*} $p < 0.05$ vs SAMP8-saline. One way ANOVA followed by Tukey post hoc test.

4. Discussion

In the present study we assessed, for the first time, the role of JNK pathway on tau phosphorylation and subsequent effects on the memory and learning deficits shown by 6-month old SAMP8 mouse in the MWM.

Tau is a microtubule-associated protein, which plays a crucial role in stabilizing microtubules and provoking its own assembly (Maccioni and Cambiazo, 1995). Aberrant phosphorylation of tau significantly decreases its affinity for microtubules promoting disassembly and tau aggregation in PHF, which leads to NFT found in AD patients and in other tauopathies (Berger et al., 2007; Delacourte, 2006). In fact, several lines of evidence from mice and humans indicate a strong correlation between the extent of tau pathology and cognitive dysfunction (Arriagada et al., 1992; Ashe and Zahs, 2010; Bancher et al., 1993; Guillozet et al., 2003; Orejana et al., 2012).

Many kinases and phosphatases are involved in the regulatory mechanisms of tau phosphorylation. The kinases Cdk5 and GSK-3 β have been extensively studied in the SAMP8 mouse (Canudas et al., 2005; Orejana et al., 2012; Tajés et al., 2008). However, little has been described about the role of JNK pathway on tau pathology in this mouse model, although it is well known the importance of JNK in tau phosphorylation (Ploia et al., 2011; Yoshida et al., 2004). We would like to highlight that Kumar et al. (2000), reported high levels of MAPKK4 mRNA in the hippocampus of aged SAMP8 mice. MAPKK4 is a kinase associated with neurodegenerative disorders, like AD (Butterfield and Poon, 2005) and it is the main responsible of the activation of p-JNK (Kim et al., 2006). In addition, a more recent study has observed increased levels of p-JNK in the cortex of 3 month old SAMP8 mice (Tajés et al., 2010). In agreement with these investigations, when levels of p-JNK and p-c-Jun in both SAMR1 and SAMP8 strains of mice were compared, we found increased levels of p-JNK in the hippocampus of 6-month old SAMP8 animals when compared to SAMR1 mice.

A previous study from our group demonstrated that the PDE5 inhibitor sildenafil ameliorates the cognitive decline and tau pathology in 6-month old SAMP8 mice (Orejana et al., 2012). Here we demonstrate that the same treatment of sildenafil also reverses the increased levels of both p-JNK and p-c-Jun in SAMP8 mice, in agreement with Zhao et al. (2011) who has recently reported that sildenafil is a potent inhibitor of JNK in vitro. This finding

provides another plausible mechanism to explain the beneficial effects observed in sildenafil treated animals.

In order to further elucidate the implication of JNK in the cognitive capability and tau phosphorylation in this mouse model we next administered D-JNKI-1, the most specific JNK inhibitor peptide (Borsello et al., 2003). In agreement with previous studies (Cheng et al., 2008), 6-month-old SAMP8 mouse exhibits learning and memory deficits in the MWM task in comparison to age matched SAMR1 mice. Interestingly, on the last day of the acquisition trial of the behavioural test, we showed an improvement of the learning capability of SAMP8 mice treated with the JNK inhibitor, D-JNKI-1, when compared to saline-treated SAMP8 mice. This improvement on the cognitive deficits was further confirmed when the day after their memory retention was evaluated in the probe trial test. Next, in order to understand the mechanisms underlying the cognitive improvement observed in D-JNKI-1-treated SAMP8 mice, we focused our study on the effects of JNK inhibition on tau pathology.

A broad amount of evidence indicates that p-c-Jun is a downstream target of p-JNK, which induces its phosphorylation at Ser73. D-JNKI-1 blocks the access of p-JNK to c-Jun and other substrates by a direct competitive mechanism without interfering with its activation/phosphorylation state (Barr et al., 2002; Bonny et al., 2001). Moreover, the inhibitory effect of this peptide correlates with decreased levels of phosphorylated c-Jun (Borsello et al., 2003). Because D-JNKI-1 decreased c-Jun phosphorylation levels at Ser73 in the hippocampus of SAMP8 and SAMR1 animals, we can be confident in the effectiveness of the treatment used to inhibit JNK activity.

Recently, Ploia et al. (2011) have reported a beneficial effect of D-JNKI-1 on tau pathology in a transgenic mouse model of AD. In addition, it has been demonstrated that D-JNKI-1 was able to reduce p-tau accumulations in mice with traumatic brain injury (Tran et al., 2012). Based on these premises, we subsequently measured the phosphorylation of tau at S202/T205 (AT8 epitope), which has been demonstrated to be the most appropriated antibody for analyzing JNK-induced tau phosphorylation (Ploia et al., 2011). As expected, our results show an increase in the hippocampal levels of p-tau (AT8) in 6-month old SAMP8 animals when compared with aged-matched SAMR1, in agreement with Canudas et al. (2005). Moreover, the treatment with the JNK inhibitor reversed these increased levels of phospho-tau demonstrating the involvement of JNK in the hyperphosphorylation of tau found in 6-month old SAMP8 mice and giving a plausible explanation for the improvement on the cognitive deficits

found in D-JNKI-1 treated animals. Noteworthy, the reversion of cognitive deficits and tau hyperphosphorylation observed in D-JNKI-1-treated SAMP8 mice was milder than that observed in mice treated with sildenafil (Orejana et al., 21012) highlighting the modulation of the activity of other kinases (GSK-3 β and Cdk5) in the beneficial effects afforded by the PDE5 inhibitor.

Phosphorylation at S202/T205 is an early event in tau hyperphosphorylation (Kimura et al., 1996; Lauckner et al., 2003; Maurage et al., 2003) and is associated with an early stage of the pathology in human AD brains and other tauopathies (Luna-Munoz et al., 2007; Maurage et al., 2003; Su et al., 1994). Accordingly, our findings provide further support for the potential therapeutic profile of sildenafil for the treatment of aged related memory impairments and other neurodegenerative disorders such as AD and other tauopathies.

References

- Arriagada** PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**, 631-639.
- Ashe** KH (2007) A tale about tau. *N Engl J Med* **357**, 933-935.
- Ashe** KH, Zahs KR (2010) Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* **66**, 631-645.
- Bancher** C, Braak H, Fischer P, Jellinger KA (1993) Neuropathological staging of Alzheimer lesions and intellectual status in Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* **162**, 179-182.
- Barr** RK, Kendrick TS, Bogoyevitch MA (2002) Identification of the critical features of a small peptide inhibitor of JNK activity. *J Biol Chem* **277**, 10987-10997.
- Berger** Z, Roder H, Hanna A, Carlson A, Rangachari V, Yue M, Wszolek Z, Ashe K, Knight J, Dickson D, Andorfer C, Rosenberry TL, Lewis J, Hutton M, Janus C (2007) Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J Neurosci* **27**, 3650-3662.
- Bonny** C, Oberson A, Negri S, Sauser C, Schorderet DF (2001) Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes* **50**, 77-82.
- Borsello** T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, Bogousslavsky J, Bonny CA (2003) Peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med* **9**, 1180-1186.
- Buee-Scherrer** V, Goedert M (2002) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases in intact cells. *FEBS Lett* **515**, 151-154.
- Butterfield** DA, Poon HF (2005) The Senescence-accelerated prone mouse model (SAMP8): A model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* **40**, 774-783.
- Canudas** AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallàs M (2005) Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* **126**, 1300-1304.

- Cheng H**, Yu J, Jiang Z, Zhang X, Liu C, Peng Y, Chen F, Qu Y, Jia Y, Tian Q, Xiao C, Chu Q, Nie K, Kan B, Hu X, Han J (2008) Acupuncture improves cognitive deficits and regulates the brain cell proliferation of SAMP8 mice. *Neurosci Lett* **432**, 111-116.
- Del Valle J**, Duran-Vilaregut J, Manich G, Casadesús G, Smith MA, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J, (2010) Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis* **19**, 1303-1315.
- Delacourte A** (2006) The natural and molecular history of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **9**, 187-194.
- Goñi-Allo B**, Puerta E, Ramos M, Lasheras B, Jordán J, Aguirre N (2008) Minoxidil prevents 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin depletions: role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels, Akt and ERK. *J Neurochem* **104**, 914-925.
- Guillozet AL**, Weintraub S, Mash DC, Mesulam MM (2003) Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol* **60**, 729-736.
- Hardy J**, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356.
- Kim BJ**, Ryu SW, Song BJ (2006) JNK-and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* **281**, 21256-21265.
- Kimura T**, Ono T, Takamatsu J, Yamamoto H, Ikegami K, Kondo A, Hasegawa M, Ihara Y, Miyamoto E, Miyakawa T (1996) Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia* **7**, 177-181.
- Kobayashi S**, Ishiguro K, Omori A, Takamatsu M, Arioka M, Imahori K, Uchida T (1993) A cdc2-related kinase PSSALRE/cdk5 is homologous with the 30 kDa subunit of tau protein kinase II, a proline-directed protein kinase associated with microtubule. *FEBS Lett* **335**, 171-175.
- Kosik K** (1990) Tau protein and Alzheimer's disease. *Curr Opin Cell Biol* **2**, 101-104.

- Kumar** VB, Franko MW, Farr SA, H. Armbrecht J, Morley JE (2000) Identification of Age-Dependent Changes in Expression of Senescence-Accelerated Mouse (SAMP8) Hippocampal Proteins by Expression Array Analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **272**, 657-661.
- Lauckner** J, Frey P, Geula C (2003) Comparative distribution of tau phosphorylated at Ser262 in pre-tangles and tangles. *Neurobiol Aging* **24**, 767-776.
- Lee** VM, Trojanowski JQ (2001) Transgenic mouse models of tauopathies: prospects for animal models of Pick's disease. *Neurology* **56**, S26-S30.
- Liu** W, Liu C, Zhu J, Shu P, Yin B, Gong Y, Qiang B, Yuan J, Peng X (2012) MicroRNA-16 targets amyloid precursor protein to potentially modulate Alzheimer's-associated pathogenesis in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging*. **33**, 522-534.
- Luna-Muñoz** J, Chávez-Macías L, García-Sierra F Mena R (2007) Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-Dependent Tau epitopes in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* **12**, 365-375.
- Maccioni** RB, Cambiazo V (1995) Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* **75**, 835-864.
- Mandelkow** EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vandenheede JR, Mandelkow E (1992) Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett* **314**, 315-321.
- Maurage** CA, Sergeant N, RuchouxMM, HauwJJ, Delacourte A (2003) Phosphorylated serine 199 of microtubuleassociated protein tau is a neuronal epitope abundantly expressed in youth and an early marker of tau pathology. *Acta Neuropathol* **105**, 89-97.
- Mohit** AA, Martin JH, Miller CA (1995) p493F12 kinase: a novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system. *Neuron* **14**, 67-78.
- Orejana** L, Barros-Miñones L, Jordán J, Puerta E, Aguirre N (2012) Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model. *Neurobiol Aging* **33**, 11-20.

- Pallas M**, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesus G (2008) From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis* **15**, 615-624.
- Ploia C**, Antoniou X, Sclipa A, Granda V, Cardinetta D, Colombo A, Canub N, Benussic L, Ghidonic R, Forloni G, Borsello T (2011) JNK Plays a Key Role in Tau Hyperphosphorylation in Alzheimer's disease Models. *Journal of Alzheimer's disease* **26**, 315-329.
- Reynolds CH**, Utton MA, Gibb GM, Yates A, Anderton BH (1997) Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J Neurochem* **68**, 1736-1744.
- Ricobaraza A**, Cuadrado-Tejedor M., Pérez-Mediavilla A, Frechilla D, Del Río J, García-Osta A (2009) Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacology* **34**, 1721-1732.
- Sato S**, Tatebayashi Y, Akagi T, Chui DH, Murayama M, Miyasaka T, Planel E, Tanemura K, Sun X, Hashikawa T, Yoshioka K, Ishiguro K, Takashima A (2002) Aberrant tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta and JNK3 induces oligomeric tau fibrils in COS-7 cells. *J Biol Chem* **277**, 42060-42065.
- Shoji M**, Iwakami N, Takeuchi S, Waragai M, Suzuki M, Kanazawa I, Lippa CF, Ono S, Okazawa H (2000) JNK activation is associated with intracellular beta amyloid accumulation. *Brain Res Mol Brain Res* **85**, 221-233.
- Su JH**, Cummings BJ, Cotman CW (1994) Early phosphorylation of tau in Alzheimer's disease occurs at Ser-202 and is preferentially located within neurites. *Neuroreport* **5**, 2358-2362.
- Tajes M**, Gutierrez-Cuesta J, Folch J, Ferrer I, Caballero B, Smith MA, Casadesus G, Camins A, Pallàs M (2008) Lithium treatment decreases activities of tau kinases in a murine model of senescence. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**, 612-623.
- Tajes M**, Gutierrez-Cuesta J, Folch J, Ortuño-Sahagun D, Verdaguer E, Jiménez A, Junyent F, Lau A, Camins A, Pallàs M (2010) Neuroprotective role of intermittent fasting in senescence-accelerated mice P8 (SAMP8). *Exp Gerontol* **45**, 702-710.
- Tomobe K**, Nomura Y (2009) Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence. *Neurochem Res* **34**, 660-669.

- Tran** HT, Sanchez L, Brody DL (2012) Inhibition of JNK by a peptide inhibitor reduces traumatic brain injury-induced tauopathy in transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**, 116-129.
- Weston** CR, Davis RJ (2007) The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 142-149.
- Yoshida** H, Hastie CJ, McLauchlan H, Cohen P, Goedert M (2004) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK). *J Neurochem* **90**, 352-358.
- Zhao** S, Zhang L, Lian G, Wang X, Zhang H, Yao X, Yang J, Wu C (2011) Sildenafil attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF- κ B signaling pathways in N9 microglia. *Int Immunopharmacol* **11**, 468-474.
- Zhu** X, Castellani RJ, Takeda A, Nunomura A, Atwood CS, Perry G, Smith MA (2001a) Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the 'two hit' hypothesis. *Mech Ageing Dev* **123**, 39-46.
- Zhu** X, Raina AK, Rottkamp CA, Aliev G, Perry G, Boux H, Smith MA (2001b) Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/ stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **76**, 435-441.

CAPÍTULO VI

Capítulo 6

Discusión general

El **envejecimiento** puede definirse como “el cambio gradual e intrínseco en un organismo que conduce a un riesgo creciente de vulnerabilidad, pérdida de vigor, enfermedad y muerte”. A nivel del SNC el envejecimiento en humanos, así como en animales de experimentación, se asocia por una parte con el deterioro de la capacidad cognitiva y por otra, con un aumento del riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas (Barzilai y col., 2006; Mehta, 2007). El aumento de la esperanza de vida en la sociedad actual unido al hecho de que no exista una teoría que explique completamente el fenómeno del envejecimiento, ha fomentado el interés científico y social sobre este tema. En este sentido, identificar los principales marcadores del envejecimiento y su interacción se hace necesario para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a tratar de prevenir o ralentizar su progresión, así como el de las enfermedades neurodegenerativas asociadas al mismo, como la EA.

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta el desarrollo de estas investigaciones es la falta de un buen modelo animal que desarrolle y reproduzca las características que se observan en estos pacientes. El ratón de senescencia acelerada **SAMP8** se caracteriza por presentar de manera espontánea un envejecimiento acelerado que se pone de manifiesto con una menor esperanza de vida, lordosis, pérdida de pelo y disminución de la actividad física (Hamamoto y col., 1984; Takeda y col., 1994), a diferencia de la cepa control **SAMR1** que posee un patrón de envejecimiento normal (Takeda, 1999). Es interesante destacar que el ratón SAMP8 muestra además otras características como déficits en el aprendizaje y en la memoria, depósitos del péptido β -amiloide (Del Valle y col., 2010; Tomobe y Nomura, 2009), un aumento de la expresión de la proteína tau hiperfosforilada en el cerebro (Canudas y col., 2005) y neuroinflamación (Wu y col., 2005). Teniendo en cuenta todos estos aspectos, el ratón SAMP8 ha sido propuesto como un buen modelo para investigar la EA esporádica (Liu y col., 2012; Pallas y col., 2008), así como para el estudio de los mecanismos que subyacen al déficit cognitivo asociado al envejecimiento (Tomobe y Nomura, 2009), suponiendo una herramienta útil para establecer potenciales dianas terapéuticas que mejoren el declive cognitivo en ambos casos.

En el presente trabajo se ofrecen nuevas evidencias sobre la implicación de las patologías tau y amiloide en los déficits cognitivos que presenta este modelo animal a distintas edades. Además, se identifican las principales cascadas de señalización intracelular

implicadas en dichas patologías lo que nos permite señalar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento.

El **sildenafil** es un inhibidor de la enzima PDE5 que fue aprobado inicialmente para el tratamiento de la disfunción eréctil y en la actualidad también se comercializa para tratar la hipertensión pulmonar (Mostafa, 2008). Aparte de sus aplicaciones médicas, se ha demostrado que el sildenafil produce una mejora de la memoria en la rata y en el ratón (Baratti y Boccia 1999; Prickaerts y col., 2002; Rutten y col., 2005) y disminuye el deterioro cognitivo inducido tras la inhibición de la NOS, el bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos, la diabetes o un shock eléctrico (Devan y col., 2004; 2006; 2007; Patil y col., 2006). Recientemente se ha demostrado, además, que el sildenafil restablece la pérdida de la función cognitiva observada en distintos modelos de ratón transgénicos para la EA (Cuadrado-Tejedor y col., 2011; Puzzo y col., 2009).

Basándonos en todas estas premisas nos propusimos estudiar si el sildenafil, en una dosis comparable a la que se usa en los humanos, era capaz de revertir el deterioro del aprendizaje y de la memoria que mostraron los ratones SAMP8 de 6 y 9 meses de edad en el MWM. Además, en el caso de los ratones de 9 meses se hizo una prueba adicional: el test de la evitación pasiva. Los resultados demuestran que el tratamiento con sildenafil mejora el déficit cognitivo de los ratones SAMP8 en las diferentes pruebas a las que fueron sometidos. Con el objetivo de analizar los mecanismos que subyacen a estos efectos beneficiosos, estudiamos el efecto del sildenafil sobre las principales patologías asociadas al deterioro cognitivo que presenta el ratón SAMP8: la **patología tau** y la **patología amiloide**.

Se ha descrito que los ratones SAMP8, ya desde los 5 meses de edad, presentan una marcada hiperfosforilación de tau que está implicada en la degeneración neurofibrilar y en el proceso de envejecimiento acelerado que caracteriza a este modelo de ratón (Canudas y col., 2005; García-Matas y col., 2008; Sureda y col., 2006). Por esta razón, en una primera parte del trabajo en la que nos centramos en el estudio de la patología tau utilizamos ratones SAMP8 y SAMR1 de 6 meses de edad. Sin embargo, los acúmulos del péptido A β se observan en el hipocampo de los ratones SAMP8 a edades más avanzadas y aumentan en número y extensión en función de la misma (Del Valle y col., 2010). Por ello, la valoración del efecto del sildenafil sobre la patología amiloide se realizó en ratones de 9 meses de edad.

Los resultados de los trabajos presentados en esta memoria demuestran que el sildenafil es capaz de revertir ambas patologías, tau y amiloide, en este modelo animal. Teniendo en cuenta que la disminución de los niveles de fosfo-tau así como del péptido A β se han relacionado directamente con una mejora cognitiva en diversos modelos animales (Arriagada y col., 1992; Ashe y Zahs, 2010; Bancher y col., 1993; Cuadrado-Tejedor y col., 2011; Guillozet y col., 2003) y en el propio ratón SAMP8 (Kumar y col., 2000; Morley y col., 2000; 2002), la reversión de ambas patologías podría ser la causa responsable de los efectos beneficiosos en la conducta observados en los ratones administrados con sildenafil. Al analizar los posibles mecanismos intracelulares que podrían estar detrás de estos efectos positivos encontrados, destacamos principalmente la inhibición de las vías calpaína/p25/Cdk5 y p-JNK/tau y la activación de la cascada Akt/GSK-3 β (Ser9) (Fig. 10).

Calpaína/p25/Cdk5. La sobreactivación de **calpaína**, ocupa un puesto importante en la hipótesis del envejecimiento celular. Muchos estudios han observado que los niveles de la actividad de calpaína en el cerebro aumentan durante el proceso de envejecimiento (Benuck y col., 1996) y que se correlacionan inversamente con la esperanza de vida en distintos modelos animales (Nixon, 2003). Además, el incremento en la activación de calpaína está implicado en la disfunción sináptica y participa en el fenómeno de muerte neuronal que tiene lugar en la EA (Nixon y col., 1994). Entre sus muchas funciones, la calpaína regula la actividad del complejo Cdk5-p35 ya que, mediante el corte proteolítico de p35 en **p25**, produce la activación de la quinasa Cdk5 con la consecuente fosforilación de sus distintos sustratos entre los que se incluye la proteína tau (en los residuos Ser202/Thr205 reconocido por el anticuerpo AT8) (Ahlijanian y col., 2000; Augustinack y col., 2002; Patrick y col., 1999).

Por otro lado, trabajos previos han observado que **p25** también induce la producción y la acumulación de **A β** in vivo (Cruz y col., 2006) posiblemente a través de una regulación transcripcional de la expresión de la β -secretasa, **BACE1** (Wen y col., 2008). Al hilo de esta hipótesis, recientemente se ha demostrado que la activación de la calpaína aumenta los niveles de BACE1, lo que sugiere un posible mecanismo por el cual la calpaína aumenta el procesamiento amiloidogénico de la APP y, en consecuencia, la producción de A β (Liang y col., 2010). Confirmando la implicación de esta cascada intracelular en las patologías tau y amiloide, un estudio reciente ha demostrado que la sobreexpresión de un inhibidor endógeno de calpaína, calpastatina, previene la fosforilación de tau, la pérdida de sinapsis y disminuye la formación de las placas de amiloide en un modelo murino transgénico de EA (Higuchi y col., 2012).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que una disfunción de esta vía de señalización intracelular calpaina/p25/Cdk5 es la responsable, por un lado, de la hiperfosforilación de tau (reconocida por el anticuerpo AT8) que se observa en el hipocampo de los ratones SAMP8 de 6 y 9 meses de edad y, por otro, del aumento de la expresión de BACE1 y A β encontrado en estos mismos animales. La inhibición de la actividad de calpaina y de Cdk5 acompañada por el descenso de los niveles de fosfo-tau (AT8) y A β observados tras la administración de sildenafil confirman esta hipótesis y proporcionan algunas de las bases moleculares que explicarían la mejora cognitiva encontrada en los ratones SAMP8 tratados con el inhibidor de la PDE5.

Akt/GSK-3 β . A continuación, teniendo en cuenta la implicación de **GSK-3 β** en la fosforilación de tau (Ávila y col., 2004), analizamos la actividad de esta cinasa a los 6 meses de edad, pero no encontramos ninguna diferencia en los SAMP8 al compararlos con los niveles obtenidos en los SAMR1. Estos resultados están de acuerdo con aquellos publicados previamente (Canudas y col., 2005) y también con el hecho de que a esta edad, no encontramos diferencias en la hiperfosforilación de tau medida con el anticuerpo PHF-1 que va dirigido contra la fosforilación de tau en los residuos Ser396/Ser404, exactamente dónde la GSK-3 β muestra su mayor actividad de fosforilación (Augustinack y col., 2002). Sin embargo, los ratones SAMP8 de 9 meses de edad sí mostraron un aumento en los niveles de p-tau detectado mediante el anticuerpo **PHF-1**, señalando una pronunciada actividad de GSK-3 β en estos ratones añosos. La explicación de las diferencias encontradas entre los 6 y los 9 meses de edad podría ir en la línea de lo demostrado por Plattner y col. (2006), quienes observaron que la sobreactivación de Cdk5 (hecho que nosotros hemos observado en los ratones SAMP8 de 6 meses de edad) produce una inhibición compensatoria de la GSK-3 β , regulación que se pierde durante el proceso de envejecimiento.

Asimismo, varios estudios han evidenciado el efecto beneficioso de la inhibición de GSK-3 β en el procesamiento amiloidogénico de la APP en ratones transgénicos para la EA (Serenio y col., 2009; Su y col., 2004). Además, un trabajo reciente ha demostrado que GSK-3 β podría regular la expresión de la β -secretasa, **Catepsina B**, y, en consecuencia, modular los niveles de **A β** (Shi y col., 2012). Nuestros resultados confirman la implicación de GSK-3 β en la patología tau y amiloide en los ratones SAMP8 de 9 meses de edad, ya que el aumento de su isoforma inactiva (fosfo-Gsk3 β -ser9) mediada por sildenafil (vía un aumento significativo de los niveles de fosfo-Akt, su principal modulador) revierte los niveles elevados de PHF-1, Catepsina B y A β encontrados en el hipocampo de estos animales.

GFAP. Numerosos estudios apoyan la asociación entre la neuroinflamación y la neurodegeneración (revisado por Cacquevel y col., 2004). De hecho, trabajos recientes de neuroimagen han demostrado que la activación de la glía correlaciona con la progresión clínica de la EA (Cagnin y col., 2002; Luterma y col., 2000). Aunque se desconocen las causas concretas que llevan a este aumento de la activación glial, los acúmulos del péptido A β parecen ser unos buenos candidatos para iniciar y favorecer esta respuesta inflamatoria cerebral (McGeer y col., 2000). De acuerdo con estas premisas, analizamos también los niveles de GFAP, un buen marcador de la activación astrocitaria, en los ratones SAMP8 y SAMR1 de 9 meses de edad. Nuestros resultados demuestran que los SAMP8 presentan un aumento en la expresión de GFAP, en concordancia con lo descrito por otros autores (Wu y col., 2005). Es interesante destacar que la administración de sildenafil disminuyó significativamente la expresión de dicho marcador tanto en los ratones SAMR1 como en los SAMP8, evidenciando un posible efecto beneficioso sobre la neuroinflamación por parte del inhibidor de la PDE5, efecto que podría estar jugando un papel importante en la mejora cognitiva observada en los animales tratados con el sildenafil.

JNK. Teniendo en cuenta que el sildenafil disminuye la fosforilación de JNK en un modelo *in vitro* (Zhao y col., 2011), quisimos valorar el efecto de este fármaco en la activación de JNK en nuestros ratones. Los resultados obtenidos muestran que el sildenafil es capaz de revertir el aumento de los niveles de fosfo-JNK observado en el hipocampo de los animales SAMP8 de 6 meses de edad. De acuerdo con el hecho de que una reducción de la fosforilación de tau pudiera ser terapéuticamente beneficiosa en el deterioro del aprendizaje y de la memoria (Noble y col., 2003) y visto que el papel de la vía **JNK** en la patología **tau** observada en el ratón SAMP8 parece estar poco descrito, nos propusimos estudiar la implicación de esta vía en la hiperfosforilación de tau en este modelo de ratón. Para ello analizamos el efecto del inhibidor de JNK (D-JNKI-1) sobre el deterioro del aprendizaje y de la memoria que muestra el ratón SAMP8 a los 6 meses de edad en el MWM. Los resultados muestran que JNK- si bien no es la única cinasa implicada- parece tener un papel importante en la hiperfosforilación temprana de tau en este modelo animal, ya que la inhibición de su actividad se vio acompañada por una reversión parcial de los déficits cognitivos y una disminución significativa de los niveles de la proteína tau fosforilada.

Efecto del **sildenafil** sobre las principales vías de señalización implicadas en el déficit cognitivo mostrado por el ratón **SAMP8**

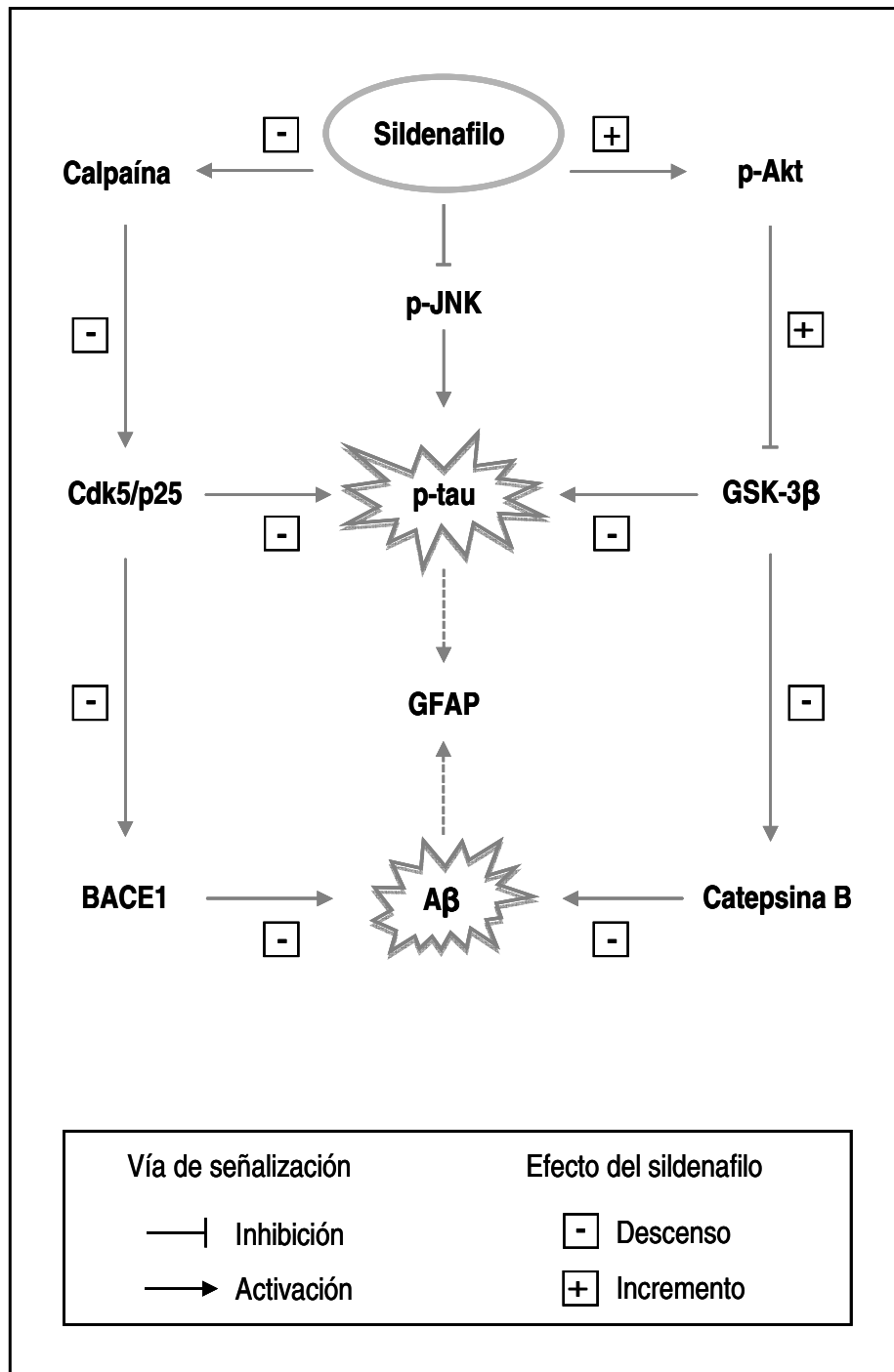


Figura 10. Mecanismo por el cual el sildenafil ejerce su efecto terapéutico sobre el deterioro cognitivo del ratón de senescencia acelerada SAMP8. El sildenafil revierte las patologías tau y amiloide a través de la activación de la cinasa Akt y la inhibición de la calpaína y de JNK. Como consecuencia, se activan una serie de cascadas de señalización intracelular que conllevan a una disminución del depósito del péptido Aβ y a una reducción de la fosforilación de tau que, en última instancia, se manifiesta en una mejora del declive cognitivo que presenta el ratón SAMP8. Akt: proteína cinasa tipo B; GSK-3β: cinasa glicógeno sintasa 3β; Cdk5: cinasa dependiente de ciclina; BACE1: β-secretasa; Aβ: péptido β-amiloide; GFAP: proteína ácida glial fibrilar; JNK: cinasa N-terminal de c-Jun.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo proponen a las cinasas Akt, Cdk5, GSK-3 β y JNK como potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento del déficit cognitivo asociado a la edad, así como de las patologías tau y amiloide que suelen ir acompañando a algunas enfermedades neurodegenerativas en particular a la EA. Además presentan a los inhibidores de la PDE5 como excelentes candidatos para el tratamiento de estas patologías. Es importante señalar en este punto que a los efectos beneficiosos del sildenafil demostrados a nivel del SNC, se le suma la ventaja de que es un fármaco que ya se utiliza en terapéutica y en particular en personas de edad avanzada. Esto supone una serie de ventajas y aspectos favorables a la hora de llevarlo a la clínica puesto que la investigación preclínica (que es la parte más cara del desarrollo de un medicamento) estaría ya cubierta y sus efectos adversos, después de más de 10 años en el mercado, son de sobra conocidos.

Bibliografía

- Ahlijanian** MK, Barrezueta NX, Williams RD, Jakowski A, Kowsz KP, McCarthy S, Coskran T, Carlo A, Seymour PA, Burkhardt JE, Nelson RB, McNeish JD (2000) Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2910-2915.
- Arriagada** PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**, 631-639.
- Ashe** KH, Zahs KR (2010) Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* **66**, 631-645.
- Augustinack** JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT (2002) Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **103**, 26-35.
- Avila** J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of Tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* **84**, 361-384.
- Bancher** C, Braak H, Fischer P, Jellinger KA (1993) Neuropathological staging of Alzheimer lesions and intellectual status in Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* **162**, 179-182.
- Baratti** CM, Boccia MM (1999) Effects of sildenafil on long-term retention of an inhibitory avoidance response in mice. *Behav Pharmacol* **10**, 731-737.
- Barzilai** N, Atzmon G, Derby CA, Bauman JM, Lipton RB (2006) A genotype of exceptional longevity is associated with preservation of cognitive function. *Neurology* **67**, 2170-2175.
- Benuck** M, Banay-Schwartz M, DeGuzman T, Lajtha A (1996) Changes in brain protease activity in aging. *J Neurochem* **67**, 2019-2029.
- Cacquevel** M, Lebourrier N, Chéenne S, Vivien D (2004) Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets* **5**, 529-534.
- Cagnin** A, Gerhard A, Banati RB (2002) In vivo imaging of neuroinflammation. *Eur Neuropsychopharmacol* **12**, 581-586.

- Canudas AM**, Gutierrez-Cuesta J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallàs M (2005) Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* **126**, 1300-1304.
- Cruz JC**, Kim D, Moy LY, Dobbin MM, Sun X, Bronson RT, Tsai LH (2006) p25/cyclin-dependent kinase 5 induces production and intraneuronal accumulation of amyloid beta in vivo. *J Neurosci* **26**, 10536-10541.
- Cuadrado-Tejedor M**, Hervias I, Ricobaraza A, Puerta E, Pérez-Roldán JM, García-Barroso C, Franco R, Aguirre N, García-Osta (2011) A Sildenafil restores cognitive function without affecting β -amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* **164**, 2029-2041.
- Del Valle J**, Duran-Vilaregut J, Manich G, Casadesús G, Smith MA, Camins A, Pallàs M, Pelegrí C, Vilaplana J (2010) Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis* **19**, 1303-1315.
- Devan BD**, Bowker JL, Duffy KB, Bharati IS, Jimenez M, Sierra- Mercado D, Jr Nelson CM, Spangler EL, Ingram DK (2006) Phosphodiesterase inhibition by sildenafil citrate attenuates a maze learning impairment in rats induced by nitric oxide synthase inhibition. *Psychopharmacology* **183**, 439-445.
- Devan BD**, Pistell PJ, Daffin LW, Jr Nelson CM, Duffy KB, Bowker JL, Bharati IS, Sierra-Mercado D, Spangler EL, Ingram DK (2007) Sildenafil citrate attenuates a complex maze impairment induced by intracerebroventricular infusion of the NOS inhibitor Nomega- nitro-L-arginine methyl ester. *Eur J Pharmacol* **563**, 134-140.
- Devan BD**, Sierra-Mercado D, Jr Jimenez M, Bowker JL, Duffy KB, Spangler EL, Ingram DK (2004) Phosphodiesterase inhibition by sildenafil citrate attenuates the learning impairment induced by blockade of cholinergic muscarinic receptors in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **79**, 691-699.
- García-Matas S**, Gutierrez-Cuesta J, Coto-Montes A, Rubio-Acero R, Díez-Vives C, Camins A, Pallàs M, Sanfeliu C, Cristòfol R (2008) Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Ageing Cell* **7**, 630-640.
- Guillozet AL**, Weintraub S, Mash DC, Mesulam MM (2003) Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol* **60**, 729-736.

- Hamamoto** H, Honma A, Irino M, Matsushita T, Toda K, Matsumura M, Takeda T (1984) Grading score system: A method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* **26**, 91-102.
- Higuchi** M, Iwata N, Matsuba Y, Takano J, Suemoto T, Maeda J, Ji B, Ono M, Staufenbiel M, Suhara T, Saido TC (2012) Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology. *FASEB J* **26**, 1204-1217.
- Kumar** VB, Farr SA, Flood JF, Kamlesh V, Franko M, Banks WA, Morley JE (2000) Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides* **21**, 1769-1775.
- Liang** B, Duan BY, Zhou XP, Gong JX, Luo ZG (2010) Calpain activation promotes BACE1 expression, amyloid precursor protein processing, and amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* **285**, 27737-27744.
- Liu** W, Liu C, Zhu J, Shu P, Yin B, Gong Y, Qiang B, Yuan J, Peng X (2012) MicroRNA-16 targets amyloid precursor protein to potentially modulate Alzheimer's-associated pathogenesis in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* **33**, 522-534.
- Luterman** JD, Haroutunian V, Yemul S, Ho L, Purohit D, Aisen PS, Mohs R, Pasinetti GM (2000) Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia. *Arch Neurol* **57**, 1153-1160.
- McGeer** PL, McGeer EG, Yasojima K (2000) Alzheimer disease and neuroinflammation. *J Neural Transm Suppl* **59**, 53-57.
- Mehta** PD (2007) Amyloid beta protein as a marker or risk factor of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **4**, 359-363.
- Morley** JE, Farr SA, Flood JF (2002) Antibody to amyloid beta protein alleviates impaired acquisition, retention, and memory processing in SAMP8 mice. *Neurobiol Learn Mem* **78**, 125-138.
- Morley** JE, Kumar VB, Bernardo AE, Farr SA, Uezu K, Tumosa N, Flood JF (2000) Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides* **21**, 1761-1767.

- Mostafa T** (2008) Oral phosphodiesterase type 5 inhibitors: nonrectogenic beneficial uses. *J Sex Med* **5**, 2502-2518.
- Nixon RA** (2003) The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Res Rev* **2**, 407-418.
- Nixon RA**, Saito KI, Grynspan F, Griffin WR, Katayama S, Honda T, Mohan PS, Shea TB, Beermann M (1994) Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* **747**, 77-91.
- Noble W**, Olm V, Takata K, Evelyn Casey, Mary O, Meyerson J, Gaynor K, LaFrancois J, Wang L, Kondo T, Davies P, Burns M, Veeranna Nixon R, Dickson D, Matsuoka Y, Ahlijanian M, Lau L-F, Duff K (2003) Cdk5 Is a Key Factor in Tau Aggregation and Tangle Formation In Vivo. *Neuron* **38**, 555-565.
- Pallas M**, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesus G (2008) From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis* **15**, 615-624.
- Patil CS**, Singh VP, Kulkarni SK (2006) Modulatory effect of sildenafil in diabetes and electroconvulsive shock-induced cognitive dysfunction in rats. *Pharmacol Rep* **58**, 373-380.
- Patrick GN**, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkesn P, Tsai LH (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**, 615-622.
- Plattner F**, Angelo M, Giese, KP (2006) The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem* **281**, 25457-25465.
- Prickaerts J**, de Vente J, Honig W, Steinbusch HW, Blokland A (2002) cGMP, but not cAMP, in rat hippocampus is involved in early stages of object memory consolidation. *Eur J Pharmacol* **436**, 83-87.
- Puzzo D**, Staniszewski A, Deng SX, Privitera L, Leznik E, Liu S, Zhang H, Feng Y, Palmeri A, Landry DW, Arancio O (2009) Phosphodiesterase 5 inhibition improves synaptic function, memory, and amyloid-beta load in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci* **29**, 8075-8086.

- Rutten** K, Vente JD, Sik A, Ittersum MM, Prickaerts J, Blokland A (2005) The selective PDE5 inhibitor, sildenafil, improves object memory in Swiss mice and increases cGMP levels in hippocampal slices. *Behav Brain Res* **164**, 11-16.
- Serenó** L, Coma M, Rodríguez M, Sánchez-Ferrer P, Sánchez MB, Gich I, Agulló JM, Pérez M, Avila J, Guardia-Laguarta C, Clarimón J, Lleó A, Gómez-Isla T (2009) A novel GSK-3 β inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol Dis* **35**, 359-367.
- Shi** C, Zheng DD, Wu FM, Liu J, Xu J (2012) The phosphatidylinositol 3 kinase-glycogen synthase kinase 3 β pathway mediates bilobalide-induced reduction in amyloid β -peptide. *Neurochem Res* **37**, 298-306.
- Su** Y, Ryder J, Li B, Wu X, Fox N, Solenberg P, Brune K, Paul S, Zhou Y, Liu F, Ni B (2004) Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. *Biochemistry* **43**, 6899-6908.
- Sureda** FX, Gutierrez-Cuesta J, Romeu M, Mulero M, Canudas AM, Camins A, Mallol J, Pallàs M, (2006) Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Exp Gerontol* **41**, 360-367.
- Takeda** T (1999) Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiol Aging* **20**, 105-110.
- Takeda** T, Hosokawa M, Higuchi K (1994) Senescence accelerated mouse (SAM), a novel murine model of aging. In: *Takeda, T. (Ed.). The SAM Model of Senescence. Elsevier, Amsterdam*, pp. 15-22.
- Tomobe** K, Nomura Y (2009) Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence. *Neurochem Res* **34**, 660-669.
- Wen** Y, Yu WH, Maloney B, Bailey J, Ma J, Marie'l, Maurin T, Wang L, Figueroa H, Herman M, Krishnamurthy P, Liu L, Planel E, Lau LF, Lahiri DK, Duff K (2008) Transcriptional Regulation of b-Secretase by p25/cdk5 Leads to Enhanced Amyloidogenic Processing *Neuron* **57**, 680-690.
- Wu** Y, Zhang AQ, Yew DT (2005) Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. *Neurochem Int* **46**, 565-574.

Zhao S, Zhang L, Lian G, Wang X, Zhang H, Yao X, Yang J, Wu C (2011) Sildenafil attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF- κ B signaling pathways in N9 microglia. *Int Immunopharmacol* **11**, 468-474.

CAPÍTULO VII

Capítulo 7

Conclusiones

De los resultados obtenidos en la presente Tesis doctoral se puede concluir que:

1. El sildenafil restablece los déficits del aprendizaje y de la memoria y mejora la patología tau que presentan los ratones SAMP8 de 6 y 9 meses de edad, probablemente a través de la modulación de las vías Akt/GSK-3 β , Cdk5/p25 y p-JNK/tau.

2. En los ratones SAMP8 y SAMR1 de 9 meses de edad, la mejora de los déficits cognitivos observada en los ratones tratados con sildenafil podría estar mediada, además, por una modulación del procesamiento amiloidogénico de la APP y la consecuente reducción de los niveles de A β y GFAP. Este efecto beneficioso podría ser consecuencia del descenso en la expresión de las β -secretasas Catepsina B y BACE1, posiblemente a través de la modulación de las cascadas de señalización intracelular Akt/GSK-3 β y Calpaína/Cdk5/p25, respectivamente.

3. Teniendo en cuenta que la administración de D-JNKI-1, inhibidor específico de JNK, revirtió parcialmente el déficit cognitivo y la hiperfosforilación de tau en los ratones SAMP8 de 6 meses de edad, podemos confirmar la implicación de JNK en el desarrollo de la patología tau en este modelo animal.

4. En conjunto, los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de investigación presentan como posibles dianas terapéuticas a las cinasas Akt, Cdk5, GSK-3 β y JNK en el tratamiento del déficit cognitivo asociado a la edad. Nuestros resultados demuestran además que el sildenafil, al ser capaz de revertir tanto la patología tau como la amiloide, dos de los principales marcadores de la EA, en el ratón SAMP8, podría resultar un excelente candidato para el tratamiento de dicha patología y de otros trastornos asociados al envejecimiento.

