



Universidad de Navarra

Facultad de Farmacia

**Efecto Neuroprotector del Sildenafil frente a la
Hipoxia Química Inducida por la Toxina
Mitocondrial Malonato**

Lucía Barros Miñones

**Efecto Neuroprotector del Sildenafil frente a la
Hipoxia Química Inducida por la Toxina
Mitocondrial Malonato**

Memoria presentada por D^a Lucía Barros Miñones 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, octubre de 2012

Fdo: Dr. Norberto Aguirre García

*La frase más excitante que se puede oír en ciencia,
la que anuncia nuevos descubrimientos,
no es "¡Eureka!", sino "Es extraño".*

Isaac Asimov

A mis padres

Agradezco a la **Asociación de Amigos** de la Universidad de Navarra la beca predoctoral concedida.

Las investigaciones realizadas en el presente trabajo se han llevado a cabo dentro del proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación: SAF2008-05143-C03-03.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda y apoyo de todos los que me habéis acompañado durante estos últimos años. Espero haber sabido agradecer cada gesto en el momento adecuado y poder recoger en estas líneas al menos una pequeña parte de mi gratitud.

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Berta Lasheras, por sus continuas muestras de interés y de apoyo. Gracias por preocuparte siempre, por preguntar y por hacer del departamento un lugar acogedor. A la Dra. Edurne Cenarruzabeitia, gracias por enseñarme el camino al departamento de farmacología.

Al director de este trabajo, el Dr. Norberto Aguirre, me gustaría agradecerle la oportunidad de embarcarme en este proyecto y de disfrutar del “equipo Popi”. Gracias por la confianza que has depositado en mí y por todo lo que me has enseñado. Por tu rigor y visión científica. Con este proyecto se cierra un capítulo pero quién sabe qué otras puertas se abrirán.

Elena, has sido mi profesora, mi compañera, mi amiga. Me has dedicado tiempo, esfuerzo y cariño. Gracias por estos 5 años de aprendizaje, risas y recuerdos. Formamos un buen equipo incluso en la distancia. Estoy segura de que seguirá siendo así en esta nueva etapa. Es una suerte poder contar contigo.

Sin duda este trabajo no hubiera sido igual fuera del “depar de Farma”. El ambiente acogedor, el cariño, el apoyo, las risas, los cafés, el trabajo y la confianza definen este departamento. Gracias a todos los que con vuestro esfuerzo lo habéis hecho así. Mari Luz y Sandra, las principales culpables. Gracias a las dos por cuidarme, por vuestra ayuda y por los buenos momentos que hemos pasado juntas. A Rosa y Mariaja, gracias por vuestra cercanía y vuestros consejos. Rose, gracias por todo lo que me has

enseñado y por estar pendiente de mí. Echaré de menos nuestras conversaciones y espero que sigamos coincidiendo en congresos.

A los que empezasteis siendo mis compañeros de poyata y acabasteis siendo mis amigos, gracias por todo. Gracias Lur por ser la compañera perfecta. Por recompensar los días grises con canciones y risas. Por escucharme y confiar en mí. Vero, sin ti, esta tesis estaría coja. Gracias por hacer tuyo mi trabajo y ayudarme siempre con una sonrisa.

A los que han compartido “cuartito” con la argentina, gracias “boludos” por vuestra paciencia. No creáis que va a ser fácil perderme de vista. A Gorka y Marta, gracias por estar siempre ahí. Marta, gracias por tu compañía en el depar, en los viajes y en mil aventurillas; y por tu confianza. A tu lado me he sentido siempre comprendida. Gorka, gracias también a ti por tu comprensión, por escucharme siempre y por tu alegría. A Eli, gracias por tu inagotable energía y por tu contagiosa risa; por diseñar mil planes y por integrar grupos. Barbi, gracias por compartir confidencias, por hacer tuyos los problemas de todos y por tu incansable deseo de mantenernos unidos. Gracias Evitxu por tu cariño, tu sonrisa y tu sinceridad. Maite, gracias por tu entusiasmo contagioso y tu incondicional ayuda. Y Álvaro, gracias por tus consejos y por las interminables horas discutiendo de series y de la vida. Gracias por todo lo compartido dentro y fuera del laboratorio y sobre todo, gracias por vuestra amistad.

A las viejas glorias del departamento me gustaría agradecerles, especialmente, que hayan sentido precedente y que sigan manteniendo el contacto. Isa, fue una suerte poder contar contigo al principio de la tesis. Gracias por todo lo que me enseñaste, por ayudarme a dar los primeros pasos en el laboratorio. Natalia, gracias por tener siempre una palabra agradable. Patxi, gracias por tu visión científica y por tus chistes malos. Y no me olvido de las Beas; a Bea Goñi, gracias por mostrarme siempre tu interés y a la “Marquitos”, gracias por volver. Por formar parte de mi depar, por los ratitos de café, comida y charlas interminables y por tu cariño.

Y gracias a las nuevas incorporaciones: Merche, Manu, María, Xabi y Mikel. Gracias por mantener el ambiente del depar y por hacerlo vuestro. Por vuestra ilusión, por escucharme y por todo lo que ya hemos compartido estos meses. Espero que disfrutéis de esta etapa. ¡Qué envidia! Gracias Merche por tu amabilidad y ese viaje a Barcelona; Manu, gracias por tu cariño; María, gracias por tu locura. A Xabi, gracias por contagiarnos con tu alegría y tu “tranquilidad”. Y gracias Mikel por dedicarme tiempo en “las horas de Lucía”.

Gracias también a Guadalupe por escuchar y compartir. Y a Idoia y a Luis por vuestro interés. Pili, gracias por tu cariño y tu ayuda. Y Trini, gracias por tu alegría, porque cualquier conversación contigo podía acabar en una carcajada.

Gracias también a la gente del Karolinska. Gracias Ángel por acogerme en tu grupo y gracias a Marta, Laura, Francesca, Silvia, Mustafa, a los Eriks, Mónica “liquen” y Mónica “normal”, Ibai, Tobé, Lin, Raymond, Carlitos, Heela, Niclas, Andrea, Fran, Aitor, María y Marianna por hacer muy especial la estancia en Estocolmo. Tack sa mycket!!

Es difícil olvidar que estos años ha pasado mucha gente por el laboratorio. Todos habéis aportado vuestro granito de arena. Gracias a los masterianos y alumnos internos y a las visitas: Violeta, Carlos, Alfredo, Isa, Miguel... Especialmente, a Alessia y a Sara; cuánto os echamos de menos. Y a Fer, gracias por ser un excelente alumno, muy trabajador y muy divertido. Gracias a los tres por seguir en contacto y acordaros de nosotros con tanto cariño. Gracias Lola por alegrarnos con tu presencia y por ayudarme en la búsqueda del posdoc. Y gracias Jorge, por amenizar con buen humor la cuenta atrás.

Pero no todo se reduce a Farma, siempre es un placer pasear por los pasillos del edificio de investigación o de la universidad y cruzar una sonrisa o unas palabras por el camino. Gracias a las chicas de bioquímica por hacernos sentir como en casa en nuestras

múltiples visitas a vuestro departamento. Gracias a la gente de galénica y de micro, especialmente a Iosu y Susana. Y gracias también a Martin, a Gonzalo y a los bedeles, por vuestra paciencia y por dedicarme siempre una sonrisa.

A Ana y Patricia, gracias por estos 10 años. Quién nos iba a decir cuando empezamos todo lo que acabaríamos compartiendo. Gracias por ser mi familia en Pamplona, por vuestra paciencia, por los ratitos de sofá, los viajes, las excursiones, los videos, las risas, las series, las cenas y todo lo que aún está por venir. Y gracias a María por compartir con las tres tantos *momentos* especiales.

Gracias a mis masterianas: Judit, Lucía, Leo Isa y Fify. Porque aunque vernos sea a veces misión imposible, siempre estais ahí. A los ferrolanos, gracias por hacer siempre especial la vuelta a casa y por preocuparos por mis ratitas. Gracias Marimar, por alegrarme los desayunos de los miércoles. A Carlos y a Sole, por una amistad de años. Y gracias a Paula por conseguir siempre que parezca que no pasa el tiempo.

Y por último, gracias a mi familia. A todos, por vuestro cariño y vuestro interés. Por el día a día y por mil cosas que nada tienen que ver con esta tesis. Y especialmente, gracias a mis padres y mis hermanos. Sin vuestro apoyo, cariño y motivación nada de esto hubiera sido posible. GRACIAS.

Índice

Abreviaturas más empleadas	i
Capítulo I: Introducción	1
1. Isquemia cerebral	7
1.1. Definición y epidemiología	7
1.2. La cascada isquémica	9
1.3. Tratamiento farmacológico	10
1.4. Modelos experimentales de isquemia cerebral	11
1.4.1. Modelos <i>in vivo</i>	11
1.4.2. Modelos <i>in vitro</i>	12
2. Malonato	13
2.1. Excitotoxicidad	14
2.1.1. Calpaína	15
2.1.2. Cdk5	17
2.1.3. Malonato y excitotoxicidad	18
2.2. Estrés oxidativo	19
2.2.1. Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKS)	20
JNK MAPKs	22
P38 MAPKs	24
Papel de las SAPKs en la isquemia cerebral	25
2.2. Muerte neuronal	26
3. El sildenafil	30
3.1. Mecanismo de acción	31
3.2. Sildenafil e isquemia	32
Bibliografía	35
Capítulo II: Planteamiento y Objetivos	53

**Capítulo III: Modulation of the ASK1-MKK3/6-p38/MAPK signaling pathway
mediates sildenafil protection against chemical ischemia caused by malonate..... 59**

Resumen	63
Abstract	65
1. Introduction.....	67
2. Material and Methods.....	68
2.1. Drugs and chemicals.....	68
2.2. Animals, treatments, and experimental design	68
2.3. Cytochrome oxidase histochemistry and analysis of lesion size	69
2.4. In situ detection of superoxide production	70
2.5. Nitrotyrosine measurement	70
2.6. Subcellular fractionation and Western blot analysis.....	71
2.7. Data Analysis.....	72
3. Results	73
3.1. Sildenafil prevents striatal lesions caused by malonate independent of ROS generation	73
3.2. Malonate activates the ASK1/MAPKs pathway: Effect of sildenafil	75
3.3. Time-course activation of SAPKs pathway after malonate	76
3.4. Effect of sildenafil on JNK activation induced by malonate	77
3.5. JNK inhibition does not protect against malonate-induced cell death	78
3.6. Effect of sildenafil on p38 activation induced by malonate	80
3.7. Malonate neurotoxicity is mediated via p38 MAPK	81
4. Discussion	83
Acknowledgements	88
Disclosure statement.....	88
References.....	89

Capítulo IV: Inhibition of calpain-regulated p35/cdk5 plays a central role in sildenafil-induced protection against chemical hypoxia produced by malonate 99

Resumen	103
Abstract	105
1. Introduction	107
2. Material and Methods	108
2.1. Drugs and Chemicals	108
2.2. <i>In vivo</i> studies	108
2.2.1. Animals, treatments, and experimental design	108
2.2.2. Cytochrome oxidase histochemistry and analysis of lesion size	110
2.2.3. Subcellular fractionation and Western blot analysis	110
2.3. <i>In vitro</i> studies	111
2.3.1. Hippocampal slices preparation	111
2.3.2. Quantification of cell death	112
2.3.3. Quantification of cell death in propidium iodide (PI) stained hippocampal slices	112
2.3.4. Measurement of ROS production in hippocampal slices	112
2.4. Data Analysis	113
3. Results	113
3.1. Sildenafil protects against malonate-induced neurotoxicity and inhibits calpain activation	113
3.2. Sildenafil inhibits malonate-induced cdk5 activation and its translocation to the nucleus	115
3.3. Calpain inhibition protects against malonate-induced cell death	117
3.4. Cdk5 inhibition protects against malonate-induced cell death	119
3.5. Sildenafil prevents tau hyperphosphorylation caused by malonate	121
3.6. Sildenafil inhibits MEF2 cleavage induced by malonate	123
3.7. Sildenafil increases the expression of Bcl-2 and Bcl-xL	125
3.8. Sildenafil reduces cell death of hippocampal slices subjected to OGD/reoxygenation	126

3.9. Therapeutic window of sildenafil	128
4. Discussion	129
Acknowledgements	134
Disclosure statement.....	134
References.....	135
Capítulo V: Discusión general	145
1. Estrés oxidativo.....	150
2. Excitotoxicidad.....	152
3. Apoptosis	153
4. Ventana terapéutica.....	154
5. Cuestiones por resolver	157
Bibliografía.....	159
Capítulo VI: Conclusiones	167

Abreviaturas más empleadas

ACM: arteria cerebral media

AP-1: proteína activadora 1. Del inglés: activator protein 1

ASK1: cinasa 1 reguladora de la apoptosis. Del inglés: apoptosis signal-regulating kinase 1

ATP: trifosfato de adenosina. Del inglés: adenosine triphosphate

BK_{Ca}: canales de potasio regulados por calcio

CDK: cinasa dependiente de ciclina. Del inglés: cyclin dependent kinase

Cdk5: cinasa dependiente de ciclina 5. Del inglés: cyclin dependent kinase 5

cyt c: citocromo c. Del inglés: cytochrome c

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DG: giro dentado. Del inglés: dentate gyrus

ROS: especies reactivas de oxígeno. Del inglés; reactive oxygen species

FDA: Food and Drug Administration

GCs: guanilato ciclasa soluble

GMP: guanosín monofosfato. Del inglés: guanosine monophosphate

cGMP: guanosín monofosfato cíclico. Del inglés: cyclic guanosine monophosphate

IL-1: interleuquina-1

INE: Instituto Nacional de Estadística

JNK: cinasa que fosforila el extremo N-terminal de c-Jun. Del inglés: c-Jun N-terminal kinase

LDH: lactato deshidrogenasa. En inglés: lactate dehydrogenase

LTP: potenciación a largo plazo. Del inglés: Long time potential

MAPK: proteína cinasa activada por mitógenos. Del inglés: mitogen-activated protein kinase

MEF-2: factor potenciador de miocitos. Del inglés: myocyte enhancer factor-2

mito-K_{ATP}: canales mitocondriales de K⁺ sensibles a ATP

MCAo: oclusión de la arteria cerebral media. Del inglés: middle cerebral artery occlusion

MDMA: 3,4-metilendioximetanfetamina

NMDA: receptor N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico. Del inglés: nitric oxide

NT: nitrotirosina. En inglés: nitrotyrosine

OGD: privación de oxígeno y glucosa. Del inglés: oxygen and glucose deprivation

p38: cinasa activada por mitógenos de 38 KDa

PBS: buffer fosfato salino. Del inglés: phosphate-buffered saline

PDE: fosfodiesterasa. Del inglés: phosphodiesterase 5

PDE5i: inhibidor de la fosfodiesterasa 5. Del inglés: phosphodiesterase 5 inhibitor

PI: ioduro de propidio. Del inglés: propidium iodide

PI3K: fosfatidil-inositol 3 cinasa. Del inglés: phosphatidylinositol 3-kinase

PKC: quinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico tipo C

PKG: cinasa dependiente de GMPc. Del inglés: cGMP-dependent protein kinase

PPTM: poro de permeabilidad transitorio mitocondrial

pTau: tau fosforilada

TNF α : factor de necrosis tumoral- α

mRNA: RNA mensajero

SAPK: proteína cinasa activada por estrés. Del inglés: stress-activated protein kinases

SDH: succinato deshidrogenasa. En inglés: succinate dehydrogenase

SNC: sistema nervioso central

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

Capítulo I

Capítulo 1

Introducción

*La ciencia se construye a partir de aproximaciones
que gradualmente se acercan a la verdad.*

Isaac Asimov

La isquemia cerebral es el accidente cerebrovascular más frecuente. En la actualidad y a pesar de los numerosos ensayos clínicos realizados, no existe una terapia eficaz para el tratamiento agudo de esta patología. Son numerosos los motivos que explican el fracaso obtenido al trasladar los estudios preclínicos al ámbito clínico. Entre ellos cabe destacar: la reducida ventana terapéutica que presentan muchos de los productos estudiados, la dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica, la reducción de su eficacia en humanos o la aparición de múltiples efectos adversos. Por tanto, conseguir una adecuada protección o recuperación del tejido isquémico constituye, a día de hoy, un importante desafío para la comunidad científica, que queda reflejado en el elevado número de publicaciones dedicadas a este trastorno. En este sentido, en los últimos años se ha señalado a los inhibidores de la fosfodiesterasa 5, entre los que destaca el sildenafil, como posibles agentes neuroprotectores frente a la isquemia cerebral. Sin embargo, los estudios destinados a comprender el mecanismo que subyace a esta neuroprotección son escasos. Por ello, dedicamos el objetivo de este trabajo al estudio del posible efecto neuroprotector del sildenafil sobre tres de los principales procesos implicados en la isquemia cerebral y que conducen, inevitablemente, a la muerte neuronal: excitotoxicidad, estrés oxidativo y apoptosis.

1. ISQUEMIA CEREBRAL

1.1. Definición y epidemiología

El **accidente cerebrovascular** o ictus consiste en la interrupción repentina del suministro de sangre a una parte del cerebro. En el **ictus isquémico** o isquemia cerebral la presencia de un coágulo es la que interrumpe el flujo sanguíneo, mientras que el **ictus hemorrágico** es consecuencia de la rotura de un vaso sanguíneo en el cerebro, de manera que la sangre se derrama en los espacios que rodean a las células cerebrales.

En la **isquemia** la disminución, por debajo de un nivel crítico, del flujo sanguíneo cerebral global o del de un determinado territorio arterial cerebral, provoca la falta del oxígeno y la glucosa necesarios para el metabolismo cerebral. El tejido cerebral depende del aporte adecuado de oxígeno y glucosa para su funcionamiento normal, por lo que la interrupción del flujo sanguíneo al cerebro resulta en una alteración rápida del metabolismo y de diversas funciones cerebrales, y puede conducir finalmente a la muerte celular (1). Si se obturan los vasos que irrigan todo el cerebro, la lesión recibe el nombre de **isquemia global**. En cambio, si sólo se produce la oclusión de los vasos que irrigan una zona determinada, la lesión se denomina **isquemia focal** (2). La isquemia global se caracteriza por ser un proceso más homogéneo en el que la muerte celular es uniforme y ocurre de forma muy selectiva. Sin embargo, la isquemia focal es un proceso mucho más complejo en el que se produce una gradación de la lesión caracterizada por una isquemia intensa en la zona que depende estrictamente de la arteria afectada (core o núcleo) y una isquemia menos severa en su periferia (penumbra). Las células del núcleo isquémico mueren en pocos minutos y debido a la carencia de oxígeno y glucosa y el consiguiente vaciamiento energético, la zona constituye un área necrótica evidente. Alrededor de esta zona de infarto puede existir flujo sanguíneo residual suficiente para mantener la viabilidad celular durante un tiempo determinado, que dependerá de la magnitud de dicha perfusión residual (3, 4). Por tanto, en esta zona más periférica o penumbra isquémica, las neuronas muestran alteraciones de carácter funcional aunque conservan una mínima actividad metabólica que hace que preserven su integridad estructural durante más tiempo. La

muerte celular en esta zona sigue un patrón de apoptosis (5, 6) (ver figura 1). La importancia de la penumbra isquémica radica en la hipótesis de que las neuronas que sobreviven en la periferia del infarto pueden recuperarse al restablecerse el flujo sanguíneo (1).

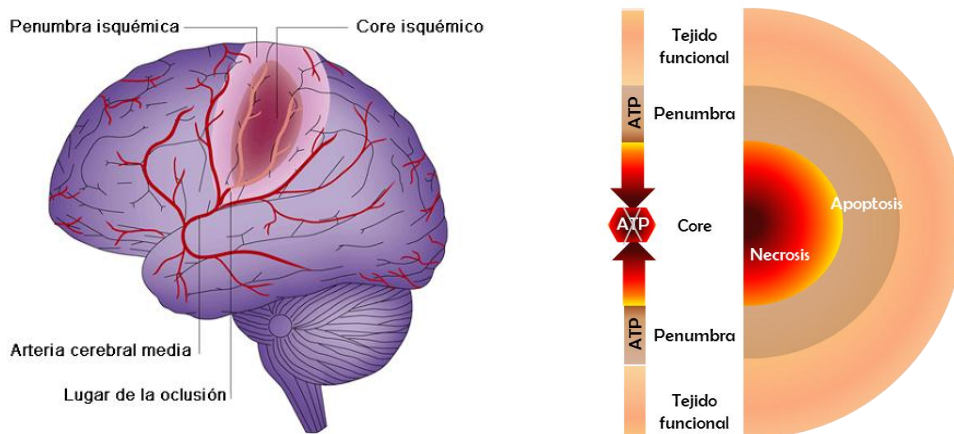


Figura 1. Daño producido tras una isquemia focal. La isquemia focal resulta en una muerte rápida en la región del core, que comprende el territorio inmediato a la arteria ocluida. La falta de ATP en esta zona condiciona la muerte necrótica. La región de penumbra isquémica rodea el core de la lesión y se acompaña de un infarto más retardado, en el que las neuronas pueden morir por apoptosis horas después del inicio de la lesión. Imágenes adaptadas de Allan y Rothwell (7) y Mehta y col. (8).

A nivel funcional, la isquemia cerebral se manifiesta por la aparición súbita de déficits neurológicos transitorios o permanentes y puede afectar a los sentidos, el habla, el procesamiento de ideas, la memoria y causar parálisis, coma e incluso la muerte (9, 10). Según la Organización Mundial de la Salud, los accidentes cerebrovasculares son, tras las enfermedades cardíacas y el cáncer, la tercera causa de muerte en los países industrializados y constituyen la principal causa de discapacidad en el adulto (11). En España, según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) correspondientes al año 2006, las enfermedades cerebrovasculares son la primera causa de muerte entre las mujeres y la tercera entre los hombres (12). La incidencia de estas patologías es de 155 casos por cada 100.000 habitantes y su mortalidad es del 30%. El 85% de los infartos observados en la práctica clínica son isquémicos y sólo un 15% son infartos hemorrágicos

(13). Cabe destacar que se trata de una patología que disminuye la calidad y la esperanza de vida de los afectados y además supone un notable incremento en el gasto sanitario (14). Es este impacto socio-económico el que sitúa la isquemia cerebral en un lugar prioritario dentro de la investigación científica actual.

1.2. La cascada isquémica

La interrupción del flujo sanguíneo en el cerebro provoca una secuencia de procesos patofisiológicos en el espacio y en el tiempo que en conjunto recibe el nombre de cascada isquémica.

El cerebro humano no dispone de depósitos energéticos por lo que los fenómenos que desencadena la isquemia cerebral se inician con el fracaso energético derivado de la interrupción de los procesos de fosforilación oxidativa y del déficit de producción de trifosfato de adenosina (ATP). Debido a este déficit de ATP, se produce el fallo de la ATPasa de sodio-potasio y de otras bombas iónicas dependientes de energía, lo que tiene como consecuencia la pérdida de los gradientes iónicos transmembrana.

La consiguiente despolarización provoca la liberación de moléculas implicadas en fenómenos de **excitotoxicidad** y **estrés oxidativo** en el tejido isquémico; al mismo tiempo se pone en marcha una respuesta inflamatoria local que puede amplificar el daño (cascada neuroinflamatoria) (15). Estos procesos activan mecanismos de señalización intracelular que pueden desembocar finalmente en la **muerte celular**. Ésta será de tipo necrótico o apoptótico dependiendo de la duración y la severidad del estímulo lesivo y de la disponibilidad o no de ATP (16, 17) (Ver Fig. 2).

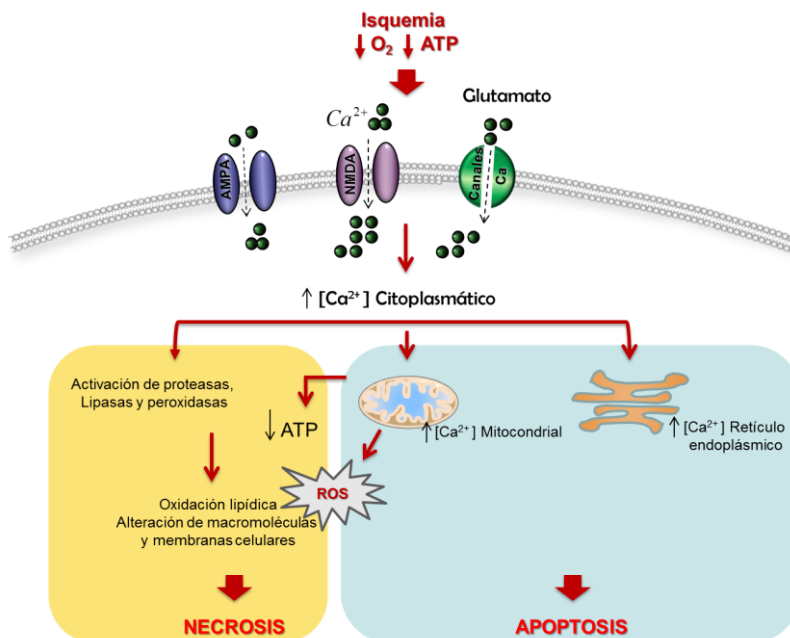


Figura 2. Secuencia de los principales eventos fisiopatológicos activados como consecuencia de una isquemia cerebral.

1.3. Tratamiento farmacológico

A pesar de los avances en la comprensión de la fisiopatología de la isquemia cerebral y de los numerosos ensayos clínicos realizados en los últimos años, los tratamientos farmacológicos de los que disponemos están destinados en su mayoría a la prevención de los accidentes cerebrovasculares. En este sentido, el ácido acetil salicílico y otros antiagregantes plaquetarios han demostrado reducir el riesgo de sufrir un infarto cerebral (18). Sin embargo, para el tratamiento agudo y la reducción del daño cerebral, las opciones son más escasas. En general, pueden plantearse dos tipos de intervenciones:

- mejorar o restablecer el flujo sanguíneo cerebral en la zona isquémica.
- aplicar medidas citoprotectoras específicas dirigidas a inhibir los trastornos celulares y moleculares responsables del desarrollo del daño por isquemia (19).

La **restauración** temprana de la perfusión del área afectada (terapia trombolítica) ha demostrado ser efectiva tanto en modelos animales como en ensayos clínicos y es la única aprobada para su uso en clínica. El activador tisular del plasminógeno (tPA) es un

fármaco fibrinolítico utilizado para restablecer el riego sanguíneo (20). A pesar de ser el único fármaco disponible, su eficacia se reduce a las tres horas que siguen a la aparición de los síntomas y los criterios de aplicación son muy restrictivos por el alto riesgo de hemorragias que comporta.

Por su parte, la **neuroprotección** tiene como objetivo primario interferir con las alteraciones bioquímicas que se producen en el área de penumbra con el fin de bloquear la denominada cascada isquémica para evitar o retrasar la evolución hacia la muerte celular. En los últimos años, numerosas sustancias (antagonistas de receptores de glutamato, antagonistas de los canales del calcio, inhibidores de la liberación de neurotransmisores; antioxidantes y moduladores de la respuesta inflamatoria) se han propuesto como posibles agentes neuroprotectores y han sido objeto de numerosas revisiones. Sin embargo, su eficacia en pacientes todavía no ha sido demostrada (21).

Por lo tanto, el estudio de los mecanismos celulares y moleculares, así como la posibilidad de modular la cadena de acontecimientos que conducen a la aparición del daño en el tejido isquémico, es primordial para tener éxito en el diseño de nuevas terapias neuroprotectoras para el tratamiento de esta patología.

1.4. Modelos experimentales de isquemia cerebral

Gran parte del conocimiento actual sobre la patología cerebrovascular se debe a la realización de estudios experimentales que han contribuido al mejor entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen al desarrollo de esta enfermedad. En el estudio de la isquemia cerebral humana, la necesidad de recurrir a los modelos experimentales ha sido, y es, especialmente relevante debido al carácter agudo de la enfermedad, a la rapidez con la que se produce el daño cerebral y, obviamente, a la limitada accesibilidad al cerebro humano.

Los modelos experimentales pueden dividirse principalmente en dos categorías:

1.4.1. *Modelos in vivo*: el estudio de la isquemia cerebral en animales de experimentación permite, bajo condiciones muy controladas, reproducir la patología humana. La isquemia cerebral global se puede reproducir a través de la oclusión de

grandes arterias que irrigan el encéfalo. Con la oclusión de 4 ó 2 vasos se consigue la interrupción completa o parcial del flujo sanguíneo reproduciendo el daño cerebral causado por un paro cardíaco o un colapso vascular sistémico. Por el contrario, los modelos de isquemia focal reproducen con más precisión los accidentes tromboembólicos que causan la mayor parte de ictus isquémicos en humanos. Se induce, en este caso, la oclusión permanente o transitoria de una arteria cerebral específica, que suele ser la arteria cerebral media, ACM (22). Existen también otros modelos *in vivo* entre los que cabe destacar la isquemia química. La administración a animales de experimentación de compuestos como el malonato o la endotelina-1, que emulan algunas de las características de la cascada isquémica, constituye una herramienta muy válida para estudiar mecanismos concretos y tener una idea más clara de las cascadas de señalización implicadas en la isquemia cerebral (23-25)

1.4.2. *Modelos in vitro*: permiten realizar estudios a nivel celular o tisular reproduciendo parcialmente las condiciones que presenta la patología *in vivo*. En ambos casos se ejerce un control total sobre el entorno fisicoquímico (pH, temperatura, presión osmótica, presión de O₂ y de CO₂). El modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD, del inglés oxygen and glucose deprivation) es el *modelo in vitro* más utilizado (26). Son frecuentes también modelos químicos en los que se simula excitotoxicidad o hipoxia mediante adición de agonistas de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) o inhibidores de la citocromo c oxidasa como el cianuro de potasio (27).

2. MALONATO

Numerosos artículos tratan de describir el papel que juega el desajuste en el metabolismo energético de la **mitocondria** en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, entre ellas, la isquemia cerebral, en la que la falta de oxígeno provoca el fallo de la cadena respiratoria (28, 29). De este modo, numerosas toxinas que afectan a la mitocondria están siendo utilizadas como herramientas farmacológicas para modelizar algunas de estas enfermedades (30).

El malonato es un inhibidor reversible de la succinato deshidrogenasa (SDH) que ha sido ampliamente utilizado para mimetizar y estudiar las características bioquímicas y neuropatológicas de la **isquemia focal** y de la **enfermedad de Huntington** (31, 25). De hecho, la administración intraestriatal de esta toxina induce la formación de lesiones cuya caracterización histológica ha revelado similitudes con las lesiones excitotóxicas observadas en ambas patologías.

Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual el malonato produce neurotoxicidad no se conoce con precisión. Se ha descrito que la inhibición del complejo II mitocondrial, reduce la producción de ATP (Figura 3) y provoca la muerte celular a través de diversos mecanismos que incluyen una excitotoxicidad secundaria mediada por la entrada masiva de calcio, la formación de radicales superóxido y apoptosis (32-34).

Por todo ello, la administración intraestriatal de malonato constituye un modelo de **hipoxia química** útil en el estudio de la cascada isquémica.

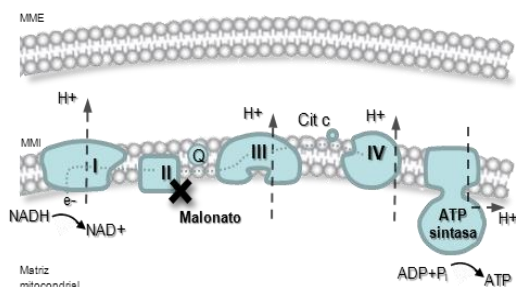


Figura 3. Mecanismo de acción del malonato. El malonato actúa inhibiendo reversiblemente el complejo II mitocondrial o succinato deshidrogenasa. Como consecuencia, se produce el fallo de la cadena de transporte de electrones y la reducción de la producción de ATP. MME: membrana mitocondrial externa. MMI: membrana mitocondrial interna.

2.1. Excitotoxicidad

La excitotoxicidad es el resultado de una excesiva estimulación de los receptores glutamatérgicos de tipo ionotrópico que lleva a la muerte neuronal, principalmente por la entrada masiva de calcio (35).

El **glutamato** es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central (SNC) y juega un papel clave en la comunicación intercelular, la plasticidad sináptica, el crecimiento y la diferenciación neuronal. En condiciones fisiológicas, los niveles extracelulares de este neurotransmisor se encuentran controlados y sus receptores NMDA están bloqueados de manera voltaje dependiente por magnesio (36). El vaciamiento energético agudo que sigue a los episodios isquémicos, provoca una despolarización anóxica que desencadena la liberación masiva de neurotransmisores al espacio extracelular, entre ellos el glutamato. Esta liberación provoca una sobreactivación tóxica de sus receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA y kainato) que tiene como resultado la entrada masiva de calcio.

Para contrarrestar esta entrada catiónica se produce una entrada de Cl^- y agua, responsable de la aparición del edema cerebral (37). La presión que puede ejercer el edema dentro de la cavidad rígida intracraneal puede restringir el flujo sanguíneo de otras zonas circundantes y generar así una isquemia secundaria (38). A diferencia de lo que ocurre en el núcleo de la lesión, en la zona de penumbra las neuronas son capaces de repolarizarse tras la liberación inicial de glutamato y K^+ , pero esto supone un gasto energético. Como los niveles de glutamato y K^+ en el medio extracelular siguen altos, las neuronas vuelven a despolarizarse. Estas repetitivas despolarizaciones también se denominan despolarizaciones peri-infarto (39), y son responsables de la propagación del área infartada (40).

El desequilibrio homeostático de la célula afecta a las cascadas de señalización intracelular y a la correcta función de los mensajeros secundarios y provoca la activación de toda una serie de enzimas catabólicas, como endonucleasas, proteasas y fosfolipasas, además de la producción de radicales libres y daño mitocondrial (41-43). Como resultado

final, se produce la disfunción y muerte celular por mecanismos que incluyen necrosis y apoptosis.

2.1.1. Calpaína

Las proteasas más directamente reguladas por Ca^{2+} son las calpaínas, una familia de cisteín proteasas que han sido definidas desde hace décadas como mediadores del daño isquémico (29) y que participan, además, en el daño neuronal asociado a múltiples enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington, entre otras (44-48).

Existen distintas isoformas de calpaína, algunas de las cuales se expresan de forma ubicua mientras que otras son específicas de tejido. La mayoría de las calpaínas son proteínas heterodiméricas formadas por una subunidad catalítica de unos 80 kDa y una subunidad reguladora más pequeña de 29 kDa. Las dos isoformas más estudiadas son la calpaína I o μ -calpaína y la calpaína II o m -calpaína, que se diferencian en la concentración de calcio, μ molar o milimolar, necesaria para su activación *in vitro*. Ambas presentan características consideradas como típicas de estas proteasas: son activadas por Ca^{2+} , su actividad es óptima a pH neutro y se localizan mayoritariamente en el citosol de las células (45, 49).

Las calpaínas no actúan como **proteasas** destructoras, sino que cortan fragmentos específicos de proteínas que frecuentemente son componentes de cascadas de señalización, modificando su función irreversiblemente. Existen numerosas proteínas identificadas como sustrato de la calpaína, entre las que destacan, factores de transcripción, receptores transmembrana, enzimas implicadas en la transducción de señales y proteínas del citoesqueleto, entre otras. Cabe mencionar, que, en condiciones normales, la activación de la calpaína dura poco tiempo, ya que los niveles de calcio intracelular vuelven rápidamente a la normalidad, por lo que la calpaína no tarda en regresar a su estado inactivo (50). Esta variedad de sustratos provoca la implicación de esta proteasa en multitud de funciones (45). Así, participa en el ciclo celular; en la regulación de la expresión génica, actuando sobre factores de transcripción como c-jun, c-fos o p53; en la transducción de señales, activando distintas cinasas como la de PKC; en el crecimiento y

movilidad celular; y también en la memoria y aprendizaje, contribuyendo a la formación de la potenciación a largo plazo (LTP).

Tras la isquemia, la activación de calpaína sigue un patrón espacio-temporal que la ha señalado como posible causa de neurodegeneración en esta patología (51, 52). La α -espectrina es degradada de forma específica por calpaína, de tal manera que se puede evaluar la expansión del área de lesión mediante la degradación de esta proteína (53). Estudios realizados en hipocampo de jerbo y en ratas han demostrado un rápido aumento en la degradación de α -espectrina que se inicia en los primeros minutos tras el accidente isquémico (51).

La actividad proteolítica de la calpaína lleva a la destrucción de numerosas proteínas y componentes celulares que condicionan la muerte celular por necrosis. Sin embargo, su activación puede contribuir a la disfunción mitocondrial a través de la ruptura de numerosas proteínas implicadas en la apoptosis (Figura 4). En concreto, la degradación de la proteína pro-apoptótica Bax por acción de la calpaína resulta en la formación de un fragmento de 18 kDa implicado en la liberación del citocromo c (cyt c) de la mitocondria, un paso fundamental en la muerte neuronal por apoptosis (54-56). Además, se ha señalado a la calpaína como responsable de la degradación y consecuente activación de otra proteína proapoptótica, Bid, en un modelo de isquemia/reperfusión cardiaca (57) y en el cerebro de ratones sometidos a excitotoxicidad con kainato (58).

Por último, algunos autores han observado propiedades neuroprotectoras en el uso de inhibidores de calpaína como MDL28170 administrados antes (59-62) e incluso después del accidente isquémico (63, 64). Sin embargo, existen ciertas limitaciones al uso clínico de estos productos como son una cierta inespecificidad y falta de permeabilidad celular o la dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica.

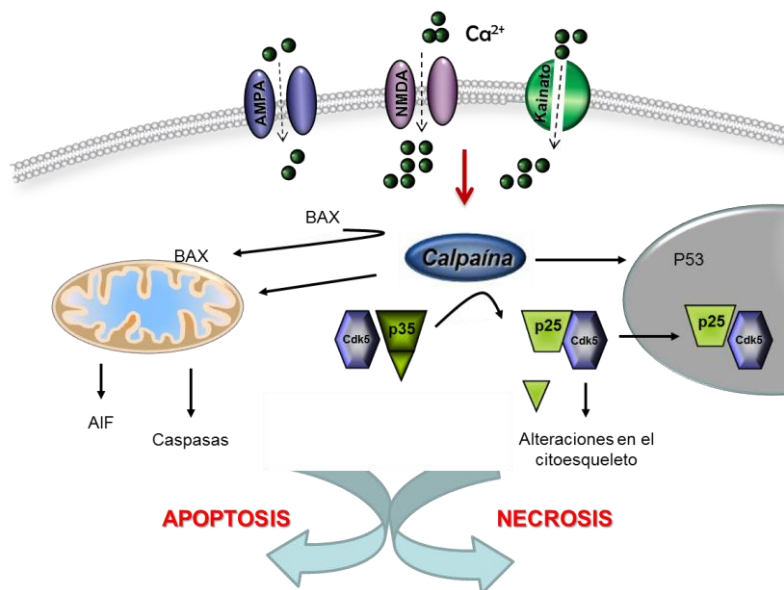


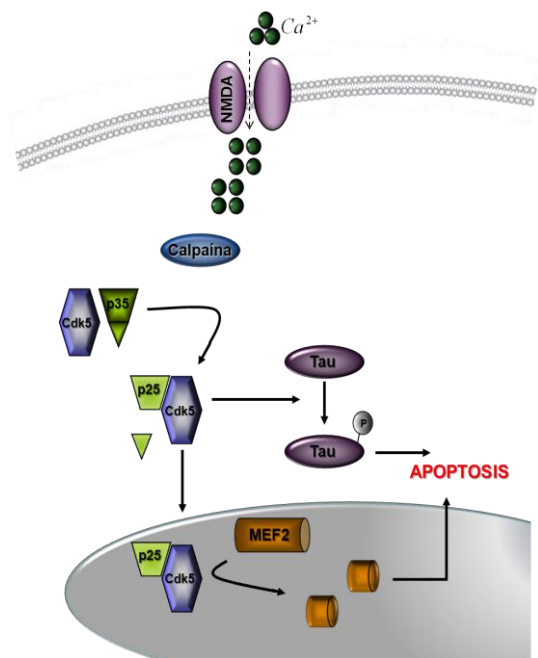
Figura 4. Muerte celular derivada de la activación de la proteasa calpaína. La actividad proteolítica de la calpaína contribuye a la muerte celular por apoptosis o necrosis dependiendo de las vías afectadas. En esta figura se muestran algunas de ellas. Modificado de Camins y col. (48).

2.1.2. Cdk5

Cdk5 es una proteína que pertenece a la familia de las cinasas dependientes de ciclinas, CDKs. Dada la amplia variedad de sustratos que fosforila, cdk5 juega un papel importante en numerosos procesos fisiológicos, como el desarrollo del SNC (65, 66), regulación del citoesqueleto (67, 68), crecimiento axonal (69), exocitosis y transporte axonal (70, 71), y plasticidad sináptica (72). Como el resto de las CDKs, cdk5 requiere para su activación la unión a una proteína reguladora, sin embargo, todavía no se ha identificado ninguna ciclina que se una a cdk5 para regular su actividad. Por el contrario, se han identificado dos proteínas necesarias para su activación y regulación, las proteínas p35 y p39. (73).

La acción proteolítica de la calpaína sobre p35 origina un fragmento más estable que es conocido como p25 (74, 75). La unión de esta molécula con cdk5 lleva, por tanto, a una activación de la cinasa más sostenida en el tiempo, así como modifica su distribución celular permitiéndole acceder a nuevos sustratos. En este estado de hiperactivación, cdk5

ha sido asociada con neurotoxicidad en numerosos procesos patológicos del SNC (76-78). El **complejo p25/cdk5** es responsable de fosforilar numerosas proteínas citoplasmáticas, entre ellas tau (74, 79); y su translocación al núcleo inhibe la activación del factor de supervivencia MEF-2 (del inglés: myocyte enhancer factor-2), contribuyendo a la muerte neuronal por apoptosis (48, 80-82) (Ver fig. 5).



Numerosos estudios han detectado niveles elevados de p25 tras procesos de excitotoxicidad, hipoxia, estrés del retículo o aumento de calcio intracelular en cultivos primarios de neuronas (74, 83), así como tras la oclusión de la ACM in vivo (84). Además, se ha relacionado la activación de p25/cdk5 con un aumento en la fosforilación de tau en el cerebro de ratas afectadas por isquemia cerebral (85). Por todo esto, Timsit y Menn (86) han sugerido la posibilidad de utilizar inhibidores de cdk5 como estrategia de neuroprotección.

Figura 5. Vías implicadas en la muerte neuronal por apoptosis iniciada por la alteración funcional de Cdk5. La acción proteolítica de calpaína sobre p35 origina el complejo p25/cdk5 que fosforila tau y promueve la degradación del factor de supervivencia MEF-2.

2.1.3. Malonato y excitotoxicidad

Como se ha comentado anteriormente, la administración intraestriatal de malonato produce un vaciamiento de la concentración de ATP y posterior despolarización celular que resultan en la formación de lesiones parecidas a las generadas por agonistas de receptores NMDA. Aunque los mecanismos exactos por los que el malonato produce neurotoxicidad no se conocen con precisión, varios estudios han demostrado que los efectos de esta toxina pueden ser bloqueados por la administración de antagonistas para

receptores NMDA, tales como el MK-801 o dizocilpina (31, 87); sugiriendo el papel clave de la excitotoxicidad en sus efectos neurotóxicos. Posteriormente, Nath y col. (88) demostraron la activación de calpaína y p25/cdk5 en ratas tras la administración de esta toxina mitocondrial.

2.2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es considerado como la principal causa de lesión tisular tras una isquemia cerebral (89, 90). La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es también una característica clave de la neurotoxicidad inducida por el malonato (91).

El **estrés oxidativo** es causado por un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Las ROS comprenden todas las moléculas derivadas del oxígeno. Aquellas ROS que pueden existir de forma independiente y que contienen uno o más electrones desapareados en sus orbitales, son además radicales libres (92). En su conjunto, todas estas moléculas, entre las que cabe destacar el anión superóxido ($O_2\cdot^-$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^-$); están implicadas en el funcionamiento normal de las células y son generadas, principalmente por la cadena respiratoria mitocondrial. En condiciones fisiológicas, son eliminadas tanto por mecanismos enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) como por mecanismos no enzimáticos (vitaminas E y C y glutatión) (93). Sin embargo, situaciones de disfunción mitocondrial pueden llevar a un aumento en la formación de estas especies.

Tras la isquemia, y especialmente tras la reperusión, se produce estrés oxidativo, provocando la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y daño estructural a nivel del ADN. El cerebro es especialmente susceptible a los efectos de estas especies reactivas dado su alto contenido lipídico. Las **ROS** generadas sirven además como importantes moléculas de señalización, activando vías celulares como la de las proteínas activadas por mitógenos, MAPKs, que desencadenan mecanismos de inflamación y apoptosis (94, 37). Son muchas las evidencias que indican que el uso de antioxidantes podría tener efectos neuroprotectores en modelos de isquemia cerebral (95, 96).

Por su parte, el malonato, induce la formación de ROS, efecto que depende directamente de la liberación de dopamina (DA) inducida por esta toxina. (33, 97-99). Al mismo tiempo, el malonato agota los dos principales sistemas antioxidantes de los que dispone la célula, glutatión y NAD(P)H. Si bien, la administración de diferentes antagonistas de NMDA es capaz de proteger contra la toxicidad del malonato, no impide la generación de radicales hidroxilo. Estos resultados parecen indicar que el estrés oxidativo inducido por esta toxina es independiente de la estimulación de los receptores de glutamato y podría preceder a la excitotoxicidad en este modelo (34).

2.2.1. Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKS)

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs, por sus siglas en inglés) son una familia de serín-treonín cinasas que, en respuesta a diferentes estímulos, regulan múltiples y antagónicos procesos celulares, tales como crecimiento, proliferación y diferenciación celular o muerte celular programada. Por ello, la falta de regulación de la actividad de estas proteínas juega un papel relevante en diversos fenómenos patológicos (100-102).

Hasta la fecha, se han caracterizado principalmente tres grandes grupos de MAPKs en mamíferos: las cinasas reguladas por señales extracelulares (**ERK1/2**), las cinasas que fosforilan el extremo N-terminal de c-Jun (**JNKs**) y las cinasas activadas por mitógenos de 38 KDa o **p38 MAPKs** (103, 104). Mientras la vía de ERK es activada por mitógenos y factores de crecimiento, y actúa promoviendo mecanismos de supervivencia celular; el estrés y los procesos inflamatorios constituyen el principal desencadenante de las cascadas de JNK y p38. Conocidas como “proteínas cinasas activadas por estrés” (SAPKs, del inglés stress-activated protein kinases), JNK y p38 median respuestas a choques osmóticos, citoquinas inflamatorias, estrés oxidativo y otras agresiones frecuentemente asociadas con decisiones de supervivencia y apoptosis (102, 105, 106).

Las MAPKs se caracterizan por transformar señales generadas en la membrana, en respuestas celulares específicas, a través de una cascada de fosforilación. La activación secuencial de un módulo MAPK (MAPKKK →MAPKK →MAPK) constituye el núcleo de señalización de esta cascada. Las MAPK cinasa cinasas, MAPKKKs, con actividad serín-

treonín cinasa, son generalmente activadas por fosforilación y/o como resultado de su interacción con una proteína G monomérica de la familia de Ras o Rho (102). La activación de las MAPKKKs conduce a la fosforilación y activación de una MAPKK, la cual estimulará la actividad de una MAPK a través de una fosforilación doble en residuos de treonina y tirosina (ver figura 6). En la célula, las MAPKs son más abundantes que las MAPKKKs, lo cual permite la amplificación de la señal.

A pesar de este patrón de activación común, existen estrictas especificidades dentro de cada módulo MAPK, preservando un cierto grado de linealidad dentro de cada ruta. En algunos casos, la especificidad de la cascada de las MAPKs está mediada por la interacción con proteínas de anclaje que organizan las rutas en módulos específicos a través de la unión simultánea de varios componentes de una misma vía (105). De todas formas, las vías de MAPKs no son independientes, sino que contienen una serie de mecanismos de conexión a lo largo de toda la cascada de señalización (100).

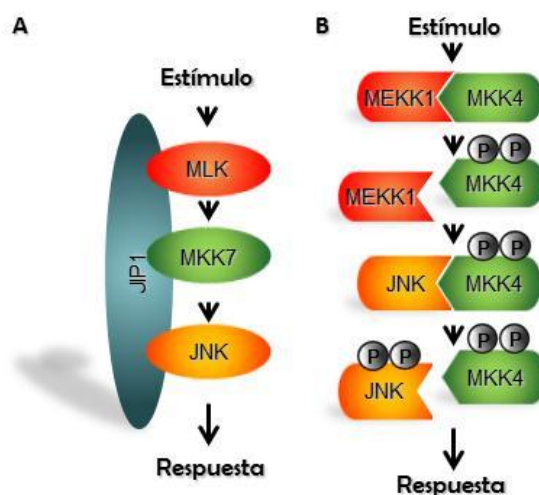


Figura 6. Mecanismos de activación y generación de especificidad en las vías de MAPKs. **A.** JIP1 actúa como proteína de anclaje uniendo las MAPKs MLK, MKK7 y JNK, por ejemplo, en un módulo de señalización específico y dinámico. **B.** Interacción secuencial y específica entre miembros de una cascada de fosforilación. MEKK1 (MAPKKK) interacciona con la forma inactiva de MKK4 (MAPKK) formando un complejo. Una vez activada por fosforilación, MKK4 interacciona con JNK (MAPK) y la fosforila. Finalmente, la forma activa de JNK se libera del complejo para fosforilar a sus sustratos. Modificada de Chang y col. (104).

Una vez activadas, las MAPKs fosforilan selectivamente a sus sustratos en residuos de serina o treonina seguidos de una prolina. En el núcleo, las MAPK actúan regulando la transcripción génica mediante la fosforilación de factores de transcripción tales como c-Jun, c-Fos, ATF2, MEF-2, STAT3 o p53. Además, participan en la regulación de la funcionalidad celular mediante la fosforilación de proteínas citoplasmáticas, proteínas del citoesqueleto u otras proteínas cinasas (102, 105, 107).

Uno de los principales mecanismos para inhibir esta cascada de señalización es mediante defosforilación. Las MAP cinasas fosfatasas, entre las que destacan PP2A y PP2C α , son un grupo de proteínas capaces de desactivar (retirar los grupos fosfato) las MAPKs, estableciendo el fin de la función que venían desempeñando. Dado que la activación de las MAPKs por fosforilación es reversible, mantener un equilibrio entre cinasas y fosfatasas resulta imprescindible para la correcta regulación de la vía (108, 100).

JNK MAPKs

La proteína cinasa JNK recibe su nombre por fosforilar el dominio N-terminal de trans-activación del factor de transcripción inducible c-Jun (109). Además, es conocida como proteína cinasa activada por estrés (SAPK) ya que responde principalmente a estímulos nocivos como calor, radiación, estrés oxidativo, citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF α), isquemia, choque térmico y agentes que dañan al ADN (103).

Las JNKs están codificadas por tres genes diferentes denominados jnk1, jnk2y jnk3 cuyo procesamiento da lugar a más de 10 isoformas distintas con masas moleculares comprendidos entre 46 y 54 kDa. Las proteínas JNK1, JNK2 y JNK3 comparten una homología de aminoácidos de hasta el 85 % en mamíferos (102). Las JNK1 y JNK2 se expresan de forma ubicua mientras que la expresión de la JNK3 tiene lugar principalmente en el cerebro (106).

MKK4 y MKK7 (también conocidas como SEK1/JNKK1 y SEK2/JNKK2) son las MAPKKs encargadas de activar JNK mediante fosforilación dual en los residuos treonina 183 (principalmente por MKK7) y tirosina 185 (principalmente por MKK4) (110).

Una vez activas, las JNKs pueden fosforilar a diferentes proteínas nucleares y citoplasmáticas. Su principal sustrato es el factor de transcripción inducible c-Jun, que es fosforilado en los residuos serina 63 y serina 73 (111). c-Jun es el componente mayoritario del factor de transcripción AP-1 (proteína activadora 1), un importante regulador de la expresión génica que contribuye al control de diversos genes de citoquinas. Además de c-jun, fosforilan otros factores de transcripción y diferentes sustratos citoplasmáticos como Tau (112). Así, la ruta de señalización de las JNKs participa en muchos y diferentes procesos celulares como la proliferación celular (113), la organogénesis durante el desarrollo embrionario (114) y la respuesta e integridad del citoesqueleto (115) (Ver figura 7).

La activación de las JNKs ha sido también relacionada con la muerte neuronal por apoptosis aunque los mecanismos concretos no se conocen con exactitud. Por un lado, regulan la liberación del cyt c en la mitocondria (116) activando por fosforilación miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 y regulando la transcripción de genes de estas proteínas (117). Por otro lado, asimismo, inactivan otras proteínas con actividad anti-apoptótica (Bcl-2, Bcl-xL) (118).

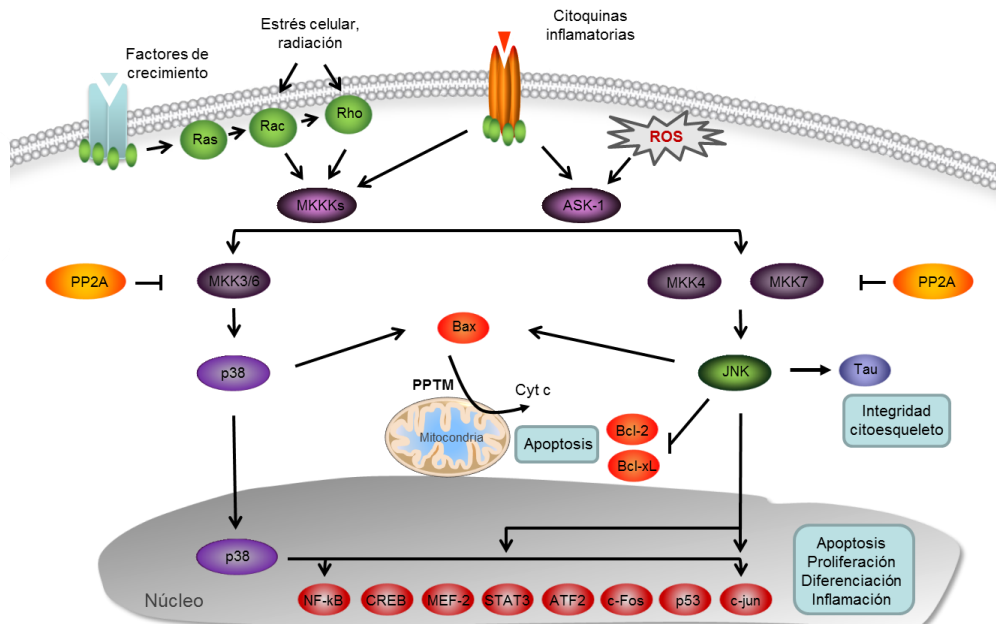


Figura 7. Vías de señalización intracelular de las MAPKs JNK y p38. La activación de JNK y p38 se produce como respuesta a diferentes estímulos. La amplia variedad de sustratos de estas cinasas las hace partícipes de numerosos procesos celulares. →: activación; ⊣: inhibición.

P38 MAPKs

La familia p38 (también conocida como SAPK2) incluye cuatro isoformas (α - δ) que presentan un 60-75% de homología y que son activadas en respuesta a estímulos estresantes extracelulares como son el TNF- α e interleuquina-1 (IL-1), radiación UV y choque osmótico (119). La isoforma α es la mejor estudiada y la que se expresa en la mayoría de tipos celulares. La activación de p38 se produce fundamentalmente a través de las MAPKKs, MKK3 y MKK6, por doble fosforilación en residuos de treonina y tirosina, siendo necesaria la fosforilación conjunta de ambos residuos para su activación (105).

La ruta de señalización de las p38 MAPKs está implicada en un gran número de procesos celulares diferentes que, dependiendo del tipo celular y del estímulo, pueden llegar a ejercer efectos opuestos. La participación de p38 en procesos inflamatorios fue una de las primeras funciones atribuidas a esta proteína. El papel que desempeña p38 en procesos inflamatorios en respuesta a TNF α y IL-1 β es debido a la activación de dos de sus sustratos: AP-1 y NF- κ B (120). También participa en el control del ciclo celular; regula la organización del citoesqueleto de actina (121), la migración celular y estimula el crecimiento y la diferenciación celulares (122, 123). Por otro lado, existen evidencias de que p38 transloca al núcleo tras su activación en respuesta a estímulos de estrés (119) donde activa por fosforilación numerosos factores de transcripción, como ATF2, CREB y MEF2 A y C, participando de esta forma en la regulación transcripcional necesaria para llevar a cabo la respuesta celular a estímulos de estrés (124) (ver figura 7).

Por último, como sucede con JNK, varios estudios sugieren un papel pro-apoptótico en el sistema nervioso de p38, que estaría mediado, en la mayoría de los casos, por la fosforilación de p53 (125-128).

Papel de las SAPKs en la isquemia cerebral

Son muchos los estudios que relacionan la activación de las SAPKs, JNK y p38, con la muerte neuronal asociada a la isquemia cerebral (129-134). Se ha afirmado que, mientras la activación de ERK1/2 protege a las células neuronales del daño isquémico, la activación de JNK y p38 sería responsable de la inducción de necrosis y apoptosis (128) (ver figura 8).

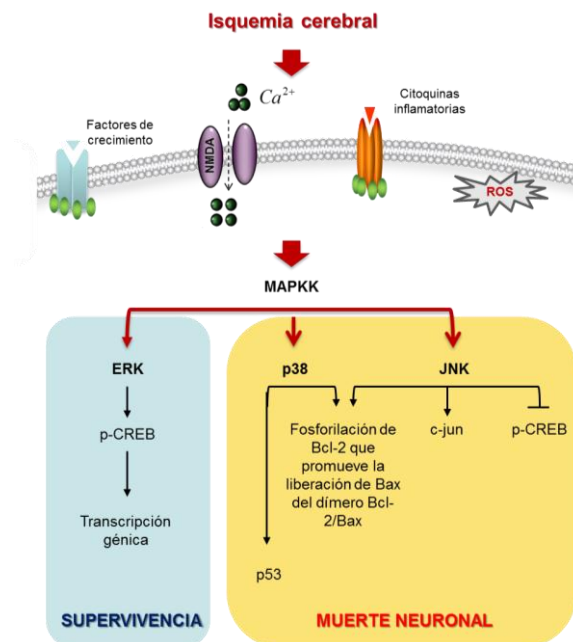


Figura 8. Representación esquemática de la activación de las MAPKs tras una isquemia cerebral y su papel en los mecanismos de muerte y supervivencia neuronal. La liberación de factores de crecimiento, neurotransmisores y mediadores de inflamación, así como la producción de ROS que siguen a la aparición de la isquemia cerebral, son capaces de activar la vía de las MAPKs. La activación de ERK promueve mecanismos de supervivencia celular a partir de la activación, entre otros, del factor de transcripción CREB. La activación de JNK y p38 tras un estímulo estresante conducirá a la muerte neuronal. Modificada de Mehta y col. (8).

Una buena aproximación para conocer el papel de las MAPKs en procesos patológicos es el uso de inhibidores específicos. La inhibición de p38 y JNK ha resultado neuroprotectora en modelos de excitotoxicidad *in vitro* e isquemia cerebral *in vivo* (129, 135, 136).

Recientemente, JNK ha sido implicada en el efecto tóxico del malonato (137) y se ha postulado que la activación de p38 estaría mediando el efecto de la proteína

proapoptótica Bax sobre la permeabilización de la membrana mitocondrial y la apoptosis neuronal inducidas por esta toxina (138). Se ha sugerido además, el papel de las ROS en la activación de p38 en este modelo de hipoxia química.

2.3. Muerte neuronal

Los procesos que constituyen la cascada isquémica, como la excitotoxicidad, la alteración de la homeostasis del calcio, el estrés oxidativo o la inflamación, pueden desembocar en una muerte celular. Caracterizar las vías que conducen a la muerte neuronal tras la isquemia es imprescindible para desarrollar tratamientos efectivos. Tradicionalmente, se creía que la muerte que tenía lugar en la isquemia era de tipo necrótico, pero las investigaciones realizadas posteriormente, han puesto de relieve la existencia de procesos apoptóticos, principalmente en la periferia del núcleo isquémico (6, 139, 140). Los factores que pueden determinar la prevalencia de la necrosis o la apoptosis son la intensidad y duración de la isquemia, el grado de madurez neuronal, la concentración de calcio intracelular y los niveles de ATP intracelulares (6).

La **necrosis** es un fenómeno pasivo que depende de las alteraciones bioquímicas producidas por el déficit energético y por la activación de enzimas líticas, proteasas como calpaína y otras enzimas que destruyen componentes celulares (3, 4). En el proceso isquémico, la necrosis suele afectar a un gran número de células, especialmente en el núcleo del infarto. En la isquemia, la disminución de energía produce el fracaso de la función de membrana con pérdida del gradiente iónico, lo que desencadena el paso de agua al interior del citoplasma y de las organelas con el consiguiente edema celular. Finalmente tiene lugar la lisis de las membranas y la liberación del contenido citoplásmico, activando así la respuesta inflamatoria. El ADN de las células necróticas se destruye en fragmentos que no siguen ningún patrón definido por la acción de endonucleasas.

Por el contrario, la **apoptosis**, también llamada muerte celular programada, es un proceso activo en el que señales específicas desencadenan una cascada de eventos que desembocan en la expresión selectiva de determinados genes (17). Durante la isquemia, la muerte apoptótica se desencadena como respuesta a diferentes estímulos como el aumento de calcio, el glutamato, la presencia de radicales libres o de citoquinas. Esto

produce una serie de cambios morfológicos en la célula (diferentes de la necrosis) que se caracterizan por la reducción del citoplasma, la preservación de las membranas, la fragmentación del ADN y la condensación periférica de la cromatina nuclear. No se produce la lisis de membranas, pero la membrana plasmática se divide dando lugar a la fragmentación de la célula en numerosas vesículas características, denominadas cuerpos apoptóticos (la identificación específica de estos cuerpos apoptóticos se puede realizar con tinciones derivadas de la uridina, TUNEL) (17). La muerte apoptótica es un fenómeno más propio de la penumbra isquémica, ya que se necesita cierta reserva energética disponible para la expresión génica y la síntesis de proteínas de novo (Figura 9).

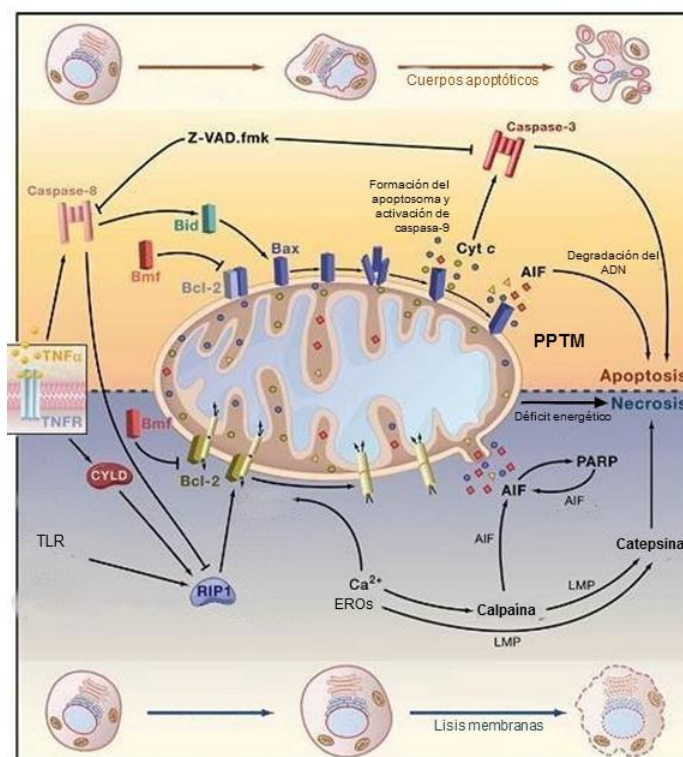


Figura 9. Mecanismos de muerte celular. Apoptosis vs. Necrosis. En la muerte por necrosis, el aumento del calcio intracelular y la activación de proteasas provocan la destrucción de componentes celulares y la lisis de las membranas. Es un proceso pasivo condicionado por un déficit energético. En la apoptosis entran en juego caspasas y proteínas de la familia Bcl-2 que conducirán a la aparición del PPTM y la formación de los cuerpos apoptóticos. En el intermedio entre ambos procesos se sitúa la necroptosis. Adaptada de Galluzzi y Kroemer (142).

A pesar de que clásicamente se han presentado a la necrosis y apoptosis como dos procesos con claras diferencias morfológicas y bioquímicas, en los últimos años se han identificado algunas células que, tras la isquemia, presentan morfologías e incluso mecanismos moleculares intermedios. Así, en el 2003, Jaeschke y Lemasters (141) acuñaron un nuevo término denominado **necroptosis**.

Los niveles intracelulares de **ATP** condicionan la decisión celular entre apoptosis y necrosis. La administración de malonato produce un rápido vaciamiento de ATP (143) en el estriado que provoca la rápida activación de mecanismos necróticos. Sin embargo, se ha demostrado también que la administración de esta toxina provoca la aparición de células TUNEL positivas e induce la degradación de las caspasas-2 y 3 (24). Las caspasas son cisteín proteasas que actúan sobre secuencias específicas que contienen residuos de aspártico y que se expresan como pro-enzimas catalíticamente inactivas. Cumplen funciones iniciadoras (activación en cadena de otras caspasas) o efectoras de los procesos promotores de apoptosis y, en concreto, la caspasa-3 ha sido ampliamente implicada en la ejecución de la apoptosis isquémica (144, 8). En efecto, las lesiones provocadas por la administración del malonato fueron atenuadas en ratones transgénicos que expresaban un inhibidor dominante negativo de la caspasa-1, así como por la inyección intraestriatal de un inhibidor de caspasas de amplio espectro (24, 145, 146). Estos resultados sugieren un papel crucial de la apoptosis en los mecanismos de toxicidad del malonato (Figura 10).

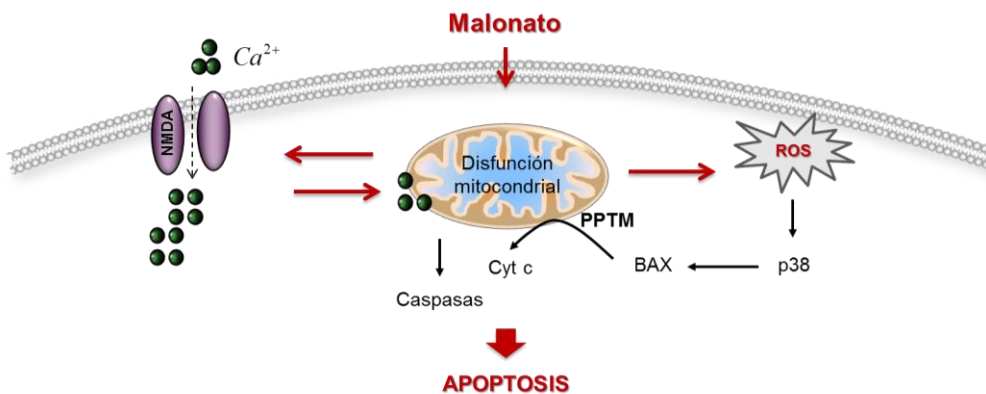


Figura 10. Activación de vías apoptóticas tras la administración del malonato.

Por otro lado, la **mitocondria** está considerada como el principal nexo de unión entre las señales de estrés celular activadas durante una lesión aguda y la ejecución de la muerte celular por apoptosis y/o necrosis (147, 148). De acuerdo con la inhibición del complejo II mitocondrial, la muerte celular provocada por el malonato parece estar inducida por mecanismos en los que la mitocondria participa de manera directa. La administración del malonato provoca el colapso del potencial mitocondrial y el agotamiento de las defensas antioxidantes, lo que conduce a la rotura de la membrana y la liberación de proteínas proapoptóticas como el cyt c al citosol a través del poro de permeabilidad transitorio mitocondrial (PPTM) (149, 150, 147). Los mecanismos exactos que conducen a la formación de este poro tras la administración del malonato no se conocen con exactitud, aunque se ha propuesto que el aumento de Ca^{2+} y ROS podría estar implicado (151). Otra vía implicada en la formación de este poro y que ha sido descrita en la toxicidad del malonato es la mediada por los miembros de la familia Bcl-2. Esta familia de proteínas reguladoras de la apoptosis incluye miembros con actividad pro-apoptótica (Bax, Bak, etc.) y anti-apoptótica (Bcl-2, Bcl-XL) que promueven o bloquean la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, respectivamente (152-154). En el estudio realizado por Gómez-lázaro y col. (138) se demuestra la implicación de Bax en la apoptosis inducida por malonato en cultivos celulares (SH-SY5Y). Células deficientes en esta proteína, así como aquellas que sobreexpresan Bcl-2 o Bcl-XL no sufren los efectos tóxicos del malonato.

3. EL SILDENAFILO

Las **fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos** (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) (155). Las PDEs se encuentran distribuidas por todo el organismo y, la mayoría, también se han localizado en el SNC (156). En los últimos años se han realizado numerosos estudios utilizando inhibidores de estas enzimas como potenciales agentes terapéuticos.

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 (157). Tras la salida del sildenafil al mercado, otros dos compuestos de la misma familia fueron patentados por diversas compañías

farmacéuticas: **vardenafile** (Levitra®) de la compañía Bayer; y **tadalafilo** (Cialis®) patentado por Icos corporation y Eli Lilly.

3.1. 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 11), 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.

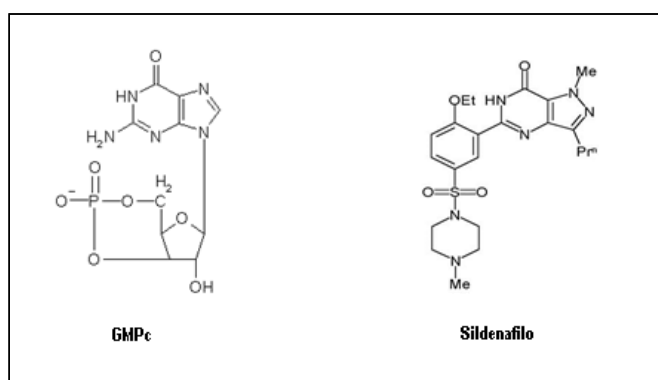


Figura 11. Estructura química del GMPc y del sildenafil.

La fosfodiesterasa 5, en concreto, cataliza la conversión de GMPc a guanosin monofosfato (GMP) y ha sido identificada en diversas partes del cuerpo como los pulmones, las plaquetas, el músculo liso y varias regiones cerebrales (158). Por tanto, el sildenafil, al inhibir la actividad de esta enzima, produce un aumento en la concentración de GMPc no sólo en el cuerpo cavernoso, sino también en otras 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), que a su vez fosforila y activa canales de potasio regulados por calcio (BK_{Ca}), una importante vía de vasodilatación (159,

160). Este hecho 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 (161), comercializándose bajo el nombre de Revatio® (Pfizer) (162, 163). 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 (164) (Figura 12).

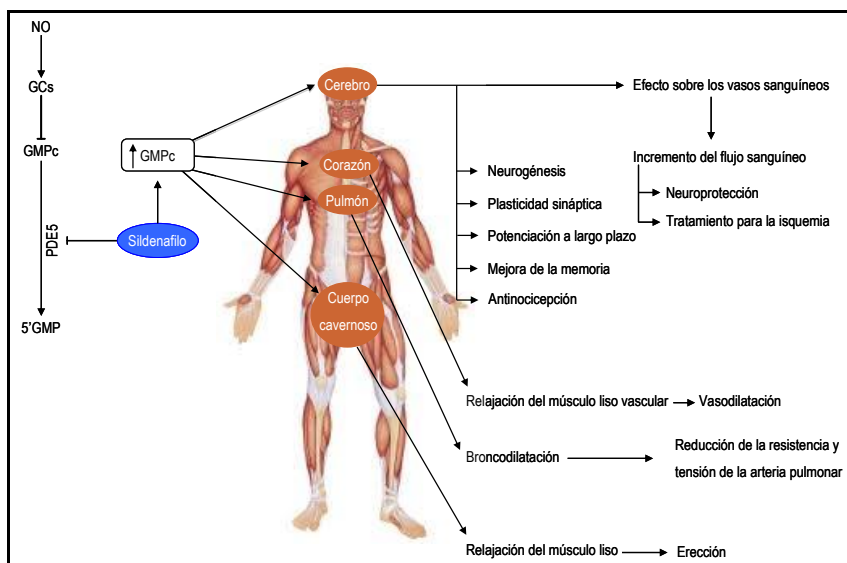


Figura 12. Efecto del incremento de los niveles de GMPc sobre diversas funciones del organismo. Adaptada de Uthayathas y col., (164).

3.2. Sildenafil e isquemia

Estudios recientes han demostrado que el sildenafil protege frente a los daños celulares producidos por procesos isquémicos en diferentes órganos, como intestino (165), colon (166), testículos (167), riñón (168), médula espinal (169) e incluso frente a la disfunción endotelial inducida por procesos de isquemia/reperfusión en seres humanos

(170). La mayoría de estos estudios surgen a partir de los trabajos iniciales llevados a cabo por el grupo del Dr. Kukreja, quienes fueron los primeros en demostrar que el sildenafil ejerce un efecto preconditionador beneficioso frente al daño producido por la isquemia/reperfusión en el corazón de conejos (171) y ratones (172). Además, demostraron que el sildenafil atenúa la necrosis, así como la apoptosis en cardiomiocitos adultos sometidos a un modelo de isquemia/reoxigenación (173).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en los últimos años, numerosas investigaciones han centrado sus esfuerzos en valorar si el potencial terapéutico del sildenafil podría extenderse al SNC. De hecho, trabajos realizados por nuestro equipo de investigación han demostrado que el sildenafil revierte los déficits serotoninérgicos producidos por el derivado anfetamínico: 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) (174) y disminuye de forma significativa la pérdida neuronal producida por la toxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico en rata (175), así como restablece los déficits de aprendizaje y memoria en un modelo de ratón de senescencia acelerada, SAMP8 (176). Otros grupos de investigación han demostrado, además, que el sildenafil es capaz de mejorar el déficit cognitivo en modelos transgénicos de enfermedad de Alzheimer (177, 178). Cabe destacar también que el sildenafil mejora los síntomas clínicos en un modelo animal de esclerosis múltiple (179) y que se ha descrito un aumento de la actividad antidepressiva de la amitriptilina en el ratón al administrarla en combinación con sildenafil (180). 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, entre ellas la isquemia cerebral.

En efecto, varios estudios han sugerido, recientemente, que los inhibidores de PDE5 podrían jugar también un papel importante en la regulación de la angiogénesis y neurogénesis, así como en la recuperación funcional tras una isquemia cerebral en ratas (181-187). Sin embargo, hasta el día de hoy, los mecanismos que median este efecto neuroprotector no han sido aclarados por completo. El aumento en los niveles de GMPc provocado por la inhibición de la PDE5 es responsable de la activación de numerosas cascadas de señalización intracelular. Se ha sugerido que la activación de la vía fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K)/Akt podría ser la responsable de la neurogénesis observada tras el

tratamiento con sildenafil a través de la fosforilación de la proteína GSK3 (188). El efecto del sildenafil sobre la angiogénesis parece estar también mediado por la activación de esta vía, así como por la activación del factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (189) (ver fig.13). Por otro lado, en isquemia cardíaca, se ha sugerido que la activación de PKG provocaría la apertura y activación de canales BK_{Ca} , un efecto vasodilatador que podría estimular o facilitar la liberación de distintos mediadores endógenos y que llevaría a la apertura de canales mitocondriales de K^+ dependientes de ATP (mito- K_{ATP}) encargados de compensar el potencial de membrana (190-192). Estudios previos realizados por nuestro equipo de investigación muestran la apertura de estos canales tras la administración de sildenafil y sugieren la implicación de este efecto en sus mecanismos de neuroprotección (175). Por otro lado, en un modelo de hipoxia cerebral se ha señalado que el sildenafil ejerce un efecto antiapoptótico mediante la inhibición de la vía de las MAPKs y el aumento de Bcl-2 (193).

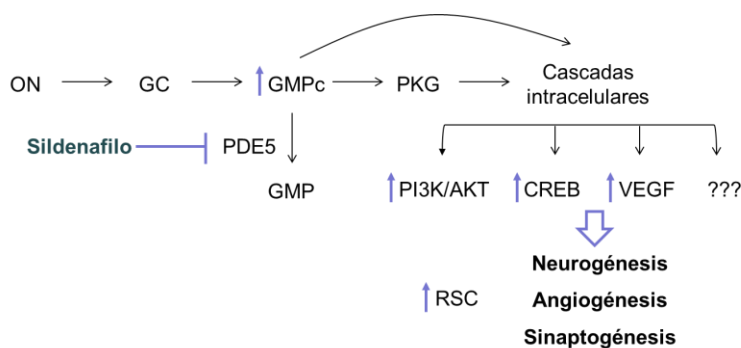


Figura 13. Efectos del incremento en los niveles de cGMP derivado de la inhibición de la PDE5. Adaptada de Bednar, 2008 (194). ON: óxido nítrico; GC: guanilato ciclasa; GMP: guanosín monofosfato; GMPc: guanosín monofosfato cíclico; PDE5: fosfodiesterasa 5; PI3K: fosfoinositol 3 cinasa; CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; RSC: riego sanguíneo cerebral. →: activación; | : inhibición.

Basándose en estos hallazgos, Silver y col. (195) realizaron un estudio clínico para establecer la seguridad del tratamiento con sildenafil en pacientes con ictus isquémico. A la espera de nuevos ensayos que determinen la eficacia de este inhibidor de PDE5 en pacientes con isquemia cerebral, es necesario realizar más estudios en animales de experimentación que ahonden en la comprensión de los mecanismos por los que el sildenafil ejerce su efecto neuroprotector.

Bibliografía

1. De Lecinana MA. Fisiopatología de la isquemia cerebral. (2008). *Guía neurológica: Enfermedad Cerebrovascular* **8**: Editado por: Asociación Colombiana de Neurología.
2. Garcia JH. The neuropathology of stroke. (1975). *Hum Pathol* **6**: 583-98.
3. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. (1992). *J Neurosurg* **77**: 337-54.
4. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. (1992). *J Neurosurg* **77**: 169-84.
5. Hossmann KA. Ischemia-mediated neuronal injury. (1993). *Resuscitation* **26**: 225-35.
6. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. (1999). *Physiol Rev* **79**: 1431-568.
7. Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. (2001). *Nat Rev Neurosci* **2**: 734-44.
8. Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. (2007). *Brain Res Rev* **54**: 34-66.
9. Weinberger J, Papamitsakis N, Newfield A, Godbold J, Goldman M. Plaque morphology correlates with cerebrovascular symptoms in patients with complex aortic arch plaque. (2000). *Arch Neurol* **57**: 81-4.
10. Díez-Tejedor E, del Brutto O, Alvarez Sabin J, Muñoz M, Abiusi G. [Classification of the cerebrovascular diseases. Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society]. (2001). *Rev Neurol* **33**: 455-64.
11. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. (2010). *World Health Organization*. 10th Edition.
12. Díaz-Guzmán J, Egido J, Abilleira S, Barberá G, Gabriel R. Incidencia del ictus en España: Datos prelimiarios crudos del estudio IBERICTUS. (2007). *Neurología* **22**: 605.
13. Iadecola C. Mechanisms of cerebral ischemic damage in Cerebral Ischemia: Molecular and Cellular Pathophysiology (1999). *Human Press Totowa* **1**: 3-32.

14. Montaner J, Alvarez-Sabin J. [NIH stroke scale and its adaptation to Spanish]. (2006). *Neurologia* **21**: 192-202.
15. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. (2003). *Nat Rev Neurosci* **4**: 399-415.
16. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. (1995). *Am J Pathol* **146**: 3-15.
17. Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. (2001). *J Cereb Blood Flow Metab* **21**: 99-109.
18. Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. (2004). *NeuroRx* **1**: 36-45.
19. Diez-Tejedor E, de Lecinana MA, Hachinski VC. [Management of patients with acute phase of stroke]. (1996). *Rev Neurol* **24**: 40-54.
20. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. (1995). *N Engl J Med* **333**: 1581-7.
21. Fernández-Gómez FJ, Hernández F, Argandoña L, Galindo MF, Segura T, Jordán J. Farmacología de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo. (2008). *REV NEUROL* **47**: 253-60.
22. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. (1981). *J Cereb Blood Flow Metab* **1**: 53-60.
23. Nikolova S, Moyanova S, Hughes S, Bellyou-Camilleri M, Lee TY, Bartha R. Endothelin-1 induced MCAO: dose dependency of cerebral blood flow. (2009). *J Neurosci Methods* **179**: 22-8.
24. Schulz JB, Weller M, Matthews RT, Heneka MT, Groscurth P, Martinou JC et al. Extended therapeutic window for caspase inhibition and synergy with MK-801 in the treatment of cerebral histotoxic hypoxia. (1998). *Cell Death Differ* **5**: 847-57.
25. Beal MF, Brouillet E, Jenkins B, Henshaw R, Rosen B, Hyman BT. Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. (1993). *J Neurochem* **61**: 1147-50.

26. Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. (1993). *J Neurosci* **13**: 3510-24.
27. Woodruff TM, Thundyil J, Tang SC, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam TV. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. (2011). *Mol Neurodegener* **6**: 11.
28. Schon EA, Manfredi G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. (2003). *J Clin Invest* **111**: 303-12.
29. Chen M, Won DJ, Krajewski S, Gottlieb RA. Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. (2002). *J Biol Chem* **277**: 29181-6.
30. Browne SE, Beal MF. Toxin-induced mitochondrial dysfunction. (2002). *Int Rev Neurobiol* **53**: 243-79.
31. Greene JG, Greenamyre JT. Manipulation of membrane potential modulates malonate-induced striatal excitotoxicity in vivo. (1996). *J Neurochem* **66**: 637-43.
32. Dedeoglu A, Ferrante RJ, Andreassen OA, Dillmann WH, Beal MF. Mice Overexpressing 70-kDa Heat Shock Protein Show Increased Resistance to Malonate and 3-Nitropropionic Acid. (2002). *Exp Neurol* **176**: 262-5.
33. Ferger B, Eberhardt O, Teismann P, de Groote C, Schulz JB. Malonate-induced generation of reactive oxygen species in rat striatum depends on dopamine release but not on NMDA receptor activation. (1999). *J Neurochem* **73**: 1329-32.
34. Zeevalk GD, Bernard LP, Nicklas WJ. Oxidative stress during energy impairment in mesencephalic cultures is not a downstream consequence of a secondary excitotoxicity. (2000). *Neuroscience* **96**: 309-16.
35. Choi DW, Koh JY, Peters S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. (1988). *J Neurosci* **8**: 185-96.
36. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. (1984). *Nature* **307**: 462-5.
37. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. (1999). *Trends Neurosci* **22**: 391-7.

38. Siesjo BK, Elmer E, Janelidze S, Keep M, Kristian T, Ouyang YB et al. Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. (1999). *Acta Neurochir Suppl* **73**: 7-13.
39. Hossmann KA. Periinfarct depolarizations. (1996). *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **8**: 195-208.
40. Mies G, Iijima T, Hossmann KA. Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. (1993). *Neuroreport* **4**: 709-11.
41. Reynolds IJ, Hastings TG. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. (1995). *J Neurosci* **15**: 3318-27.
42. Peng TI, Greenamyre JT. Privileged access to mitochondria of calcium influx through N-methyl-D-aspartate receptors. (1998). *Mol Pharmacol* **53**: 974-80.
43. Berliocchi L, Bano D, Nicotera P. Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. (2005). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**: 2255-8.
44. Vosler PS, Brennan CS, Chen J. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. (2008). *Mol Neurobiol* **38**: 78-100.
45. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. (2003). *Physiol Rev* **83**: 731-801.
46. Wu HY, Tomizawa K, Matsui H. Calpain-calcineurin signaling in the pathogenesis of calcium-dependent disorder. (2007). *Acta Med Okayama* **61**: 123-37.
47. Bevers MB, Neumar RW. Mechanistic role of calpains in postischemic neurodegeneration. (2008). *J Cereb Blood Flow Metab* **28**: 655-73.
48. Camins A, Verdaguer E, Folch J, Pallas M. Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. (2006). *CNS Drug Rev* **12**: 135-48.
49. Dayton WR, Schollmeyer JV, Lepley RA, Cortes LR. A calcium-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Isolation of a low-calcium-requiring form of the protease. (1981). *Biochim Biophys Acta* **659**: 48-61.
50. Liu J, Liu MC, Wang KK. Physiological and pathological actions of calpains in glutamatergic neurons. (2008). *Sci Signal* **1**: tr3.

51. Saido TC, Yokota M, Nagao S, Yamaura I, Tani E, Tsuchiya T et al. Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain. (1993). *J Biol Chem* **268**: 25239-43.
52. Neumar RW, Meng FH, Mills AM, Xu YA, Zhang C, Welsh FA et al. Calpain activity in the rat brain after transient forebrain ischemia. (2001). *Exp Neurol* **170**: 27-35.
53. Yokota M, Saido TC, Tani E, Kawashima S, Suzuki K. Three distinct phases of fodrin proteolysis induced in postischemic hippocampus. Involvement of calpain and unidentified protease. (1995). *Stroke* **26**: 1901-7.
54. Choi WS, Lee EH, Chung CW, Jung YK, Jin BK, Kim SU et al. Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. (2001). *J Neurochem* **77**: 1531-41.
55. Wood DE, Newcomb EW. Cleavage of Bax enhances its cell death function. (2000). *Exp Cell Res* **256**: 375-82.
56. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. (2000). *Cell Death Differ* **7**: 1166-73.
57. Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC, Gottlieb RA. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. (2001). *J Biol Chem* **276**: 30724-8.
58. Takano J, Tomioka M, Tsubuki S, Higuchi M, Iwata N, Itohara S et al. Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastatin mutant mice. (2005). *J Biol Chem* **280**: 16175-84.
59. Lee KS, Frank S, Vanderklish P, Arai A, Lynch G. Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. (1991). *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7233-7.
60. Hong SC, Goto Y, Lanzino G, Soleau S, Kassell NF, Lee KS. Neuroprotection with a calpain inhibitor in a model of focal cerebral ischemia. (1994). *Stroke* **25**: 663-9.
61. Rami A, Kriegstein J. Protective effects of calpain inhibitors against neuronal damage caused by cytotoxic hypoxia in vitro and ischemia in vivo. (1993). *Brain Res* **609**: 67-70.

62. Yokota M, Tani E, Tsubuki S, Yamaura I, Nakagaki I, Hori S et al. Calpain inhibitor entrapped in liposome rescues ischemic neuronal damage. (1999). *Brain Res* **819**: 8-14.
63. Kupina NC, Nath R, Bernath EE, Inoue J, Mitsuyoshi A, Yuen PW et al. The novel calpain inhibitor SJA6017 improves functional outcome after delayed administration in a mouse model of diffuse brain injury. (2001). *J Neurotrauma* **18**: 1229-40.
64. Markgraf CG, Velayo NL, Johnson MP, McCarty DR, Medhi S, Koehl JR et al. Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. (1998). *Stroke* **29**: 152-8.
65. Ko J, Humbert S, Bronson RT, Takahashi S, Kulkarni AB, Li E et al. p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. (2001). *J Neurosci* **21**: 6758-71.
66. Smith DS, Greer PL, Tsai LH. Cdk5 on the brain. (2001). *Cell Growth Differ* **12**: 277-83.
67. Hallows JL, Chen K, DePinho RA, Vincent I. Decreased cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activity is accompanied by redistribution of cdk5 and cytoskeletal proteins and increased cytoskeletal protein phosphorylation in p35 null mice. (2003). *J Neurosci* **23**: 10633-44.
68. Smith D. Cdk5 in neuroskeletal dynamics. (2003). *Neurosignals* **12**: 239-51.
69. Nikolic M, Dudek H, Kwon YT, Ramos YF, Tsai LH. The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. (1996). *Genes Dev* **10**: 816-25.
70. Barclay JW, Aldea M, Craig TJ, Morgan A, Burgoyne RD. Regulation of the fusion pore conductance during exocytosis by cyclin-dependent kinase 5. (2004). *J Biol Chem* **279**: 41495-503.
71. Paglini G, Peris L, Diez-Guerra J, Quiroga S, Caceres A. The Cdk5-p35 kinase associates with the Golgi apparatus and regulates membrane traffic. (2001). *EMBO Rep* **2**: 1139-44.
72. Cheng K, Ip NY. Cdk5: a new player at synapses. (2003). *Neurosignals* **12**: 180-90.
73. Dhavan R, Tsai LH. A decade of CDK5. (2001). *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 749-59.

-
74. Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. (2000). *Nature* **405**: 360-4.
75. Kusakawa G, Saito T, Onuki R, Ishiguro K, Kishimoto T, Hisanaga S. Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. (2000). *J Biol Chem* **275**: 17166-72.
76. Camins A, Verdaguer E, Folch J, Canudas AM, Pallas M. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. (2006). *Drug News Perspect* **19**: 453-60.
77. Nguyen KC, Rosales JL, Barboza M, Lee KY. Controversies over p25 in Alzheimer's disease. (2002). *J Alzheimers Dis* **4**: 123-6.
78. Shelton SB, Johnson GVW. Cyclin-dependent kinase-5 in neurodegeneration. (2004). *J Neurochem* **88**: 1313-26.
79. Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. (1999). *Nature* **402**: 615-22.
80. Crespo-Biel N, Camins A, Pelegri C, Vilaplana J, Pallas M, Canudas AM. 3-Nitropropionic acid activates calpain/cdk5 pathway in rat striatum. (2007). *Neurosci Lett* **421**: 77-81.
81. Gong X, Tang X, Wiedmann M, Wang X, Peng J, Zheng D et al. Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis. (2003). *Neuron* **38**: 33-46.
82. Tang X, Wang X, Gong X, Tong M, Park D, Xia Z et al. Cyclin-dependent kinase 5 mediates neurotoxin-induced degradation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. (2005). *J Neurosci* **25**: 4823-34.
83. Saito T, Konno T, Hosokawa T, Asada A, Ishiguro K, Hisanaga S. p25/cyclin-dependent kinase 5 promotes the progression of cell death in nucleus of endoplasmic reticulum-stressed neurons. (2007). *J Neurochem* **102**: 133-40.
84. Wang J, Liu S, Fu Y, Wang JH, Lu Y. Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. (2003). *Nat Neurosci* **6**: 1039-47.
85. Green SL, Kulp KS, Vulliet R. Cyclin-dependent protein kinase 5 activity increases in rat brain following ischemia. (1997). *Neurochem Int* **31**: 617-23.

86. Timsit S, Menn B. Cerebral ischemia, cell cycle elements and Cdk5. (2007). *Biotechnol J* **2**: 958-66.
87. Messam CA, Greene JG, Greenamyre JT, Robinson MB. Intrastratial injections of the succinate dehydrogenase inhibitor, malonate, cause a rise in extracellular amino acids that is blocked by MK-801. (1995). *Brain Res* **684**: 221-4.
88. Nath R, Davis M, Probert AW, Kupina NC, Ren X, Schielke GP et al. Processing of cdk5 activator p35 to its truncated form (p25) by calpain in acutely injured neuronal cells. (2000). *Biochem Biophys Res Commun* **274**: 16-21.
89. Oliver CN, Starke-Reed PE, Stadtman ER, Liu GJ, Carney JM, Floyd RA. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5144-7.
90. Saito A, Maier CM, Narasimhan P, Nishi T, Song YS, Yu F et al. Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. (2005). *Mol Neurobiol* **31**: 105-16.
91. Fernandez-Gomez FJ, Galindo MF, Gomez-Lazaro M, Yuste VJ, Comella JX, Aguirre N et al. Malonate induces cell death via mitochondrial potential collapse and delayed swelling through an ROS-dependent pathway. (2005). *Br J Pharmacol* **144**: 528-37.
92. Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. (2004). *Curr Pharm Des* **10**: 1611-26.
93. Halliwell B, Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. (1985). *Mol Aspects Med* **8**: 89-193.
94. Namura S, Iihara K, Takami S, Nagata I, Kikuchi H, Matsushita K et al. Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11569-74.
95. Amemiya S, Kamiya T, Nito C, Inaba T, Kato K, Ueda M et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of edaravone following transient focal ischemia in rats. (2005). *Eur J Pharmacol* **516**: 125-30.

-
96. Zhang N, Komine-Kobayashi M, Tanaka R, Liu M, Mizuno Y, Urabe T. Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain. (2005). *Stroke* **36**: 2220-5.
 97. Maragos WF, Jakel RJ, Chesnut MD, Geddes JW, Dwoskin LP. Does dopamine contribute to striatal damage caused by impaired mitochondrial function? (1999). *Ann N Y Acad Sci* **893**: 345-9.
 98. Maragos WF, Young KL, Altman CS, Pocernich CB, Drake J, Butterfield DA et al. Striatal damage and oxidative stress induced by the mitochondrial toxin malonate are reduced in clorgyline-treated rats and MAO-A deficient mice. (2004). *Neurochem Res* **29**: 741-6.
 99. Xia XG, Schmidt N, Teismann P, Ferger B, Schulz JB. Dopamine mediates striatal malonate toxicity via dopamine transporter-dependent generation of reactive oxygen species and D2 but not D1 receptor activation. (2001). *J Neurochem* **79**: 63-70.
 100. Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. (2008). *Pharmacol Rev* **60**: 261-310.
 101. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. (2010). *Biochim Biophys Acta* **1802**: 396-405.
 102. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. (2007). *Oncogene* **26**: 3100-12.
 103. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. (2001). *Physiol Rev* **81**: 807-69.
 104. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. (2001). *Nature* **410**: 37-40.
 105. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. (2004). *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 320-44.
 106. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. (2000). *Cell* **103**: 239-52.

107. Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. (2007). *Curr Opin Cell Biol* **19**: 142-9.
108. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. (2005). *Cell Res* **15**: 11-8.
109. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. (1993). *Genes Dev* **7**: 2135-48.
110. Fleming Y, Armstrong CG, Morrice N, Paterson A, Goedert M, Cohen P. Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. (2000). *Biochem J* **352 Pt 1**: 145-54.
111. Barr RK, Bogoyevitch MA. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). (2001). *Int J Biochem Cell Biol* **33**: 1047-63.
112. Johnson GL, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. (2007). *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1341-8.
113. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. (2002). *Cell Res* **12**: 9-18.
114. Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, Wagner EF. Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. (1999). *Mech Dev* **89**: 115-24.
115. Huang C, Jacobson K, Schaller MD. MAP kinases and cell migration. (2004). *J Cell Sci* **117**: 4619-28.
116. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. (2000). *Science* **288**: 870-4.
117. Putcha GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B et al. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. (2003). *Neuron* **38**: 899-914.
118. Schroeter H, Boyd CS, Ahmed R, Spencer JP, Duncan RF, Rice-Evans C et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function:

- new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis. (2003). *Biochem J* **372**: 359-69.
119. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. (1995). *J Biol Chem* **270**: 7420-6.
120. Eder PS, Kekuda R, Stolc V, Altman S. Characterization of two scleroderma autoimmune antigens that copurify with human ribonuclease P. (1997). *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1101-6.
121. Schafer C, Ross SE, Bragado MJ, Groblewski GE, Ernst SA, Williams JA. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini. (1998). *J Biol Chem* **273**: 24173-80.
122. Juretic N, Santibanez JF, Hurtado C, Martinez J. ERK 1,2 and p38 pathways are involved in the proliferative stimuli mediated by urokinase in osteoblastic SaOS-2 cell line. (2001). *J Cell Biochem* **83**: 92-8.
123. Yosimichi G, Nakanishi T, Nishida T, Hattori T, Takano-Yamamoto T, Takigawa M. CTGF/Hcs24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and proliferation through a p44/42 MAPK/extracellular-signal regulated kinase (ERK). (2001). *Eur J Biochem* **268**: 6058-65.
124. Takeda K, Ichijo H. Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. (2002). *Genes Cells* **7**: 1099-111.
125. Browne SE. Mitochondria and Huntington's disease pathogenesis: insight from genetic and chemical models. (2008). *Ann N Y Acad Sci* **1147**: 358-82.
126. Harper SJ, LoGrasso P. Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. (2001). *Cell Signal* **13**: 299-310.
127. Sanchez-Prieto R, Rojas JM, Taya Y, Gutkind JS. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. (2000). *Cancer Res* **60**: 2464-72.
128. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. (1995). *Science* **270**: 1326-31.

129. Irving EA, Bamford M. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. (2002). *J Cereb Blood Flow Metab* **22**: 631-47.
130. Barone FC, Irving EA, Ray AM, Lee JC, Kassis S, Kumar S et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia. (2001). *Med Res Rev* **21**: 129-45.
131. Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF et al. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. (2003). *Nat Med* **9**: 1180-6.
132. Kovalska M, Kovalska L, Pavlikova M, Janickova M, Mikuskova K, Adamkov M et al. Intracellular Signaling MAPK Pathway After Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. (2012). *Neurochem Res*.
133. Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F, Toledo AH. Protein kinases in organ ischemia and reperfusion. (2008). *J Invest Surg* **21**: 215-26.
134. Guan QH, Pei DS, Zong YY, Xu TL, Zhang GY. Neuroprotection against ischemic brain injury by a small peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase (JNK) via nuclear and non-nuclear pathways. (2006). *Neuroscience* **139**: 609-27.
135. Repici M, Centeno C, Tomasi S, Forloni G, Bonny C, Vercelli A et al. Time-course of c-Jun N-terminal kinase activation after cerebral ischemia and effect of D-JNKI1 on c-Jun and caspase-3 activation. (2007). *Neuroscience* **150**: 40-9.
136. Barone FC, Irving EA, Ray AM, Lee JC, Kassis S, Kumar S et al. SB 239063, a second-generation p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, reduces brain injury and neurological deficits in cerebral focal ischemia. (2001). *J Pharmacol Exp Ther* **296**: 312-21.
137. Asanuma T, Inanami O, Tabu K, Waki K, Kon Y, Kuwabara M. Protection against malonate-induced ischemic brain injury in rat by a cell-permeable peptidic c-Jun N-terminal kinase inhibitor, (L)-HIV-TAT48-57-PP-JBD20, observed by the apparent diffusion coefficient mapping magnetic resonance imaging method. (2004). *Neurosci Lett* **359**: 57-60.
138. Gomez-Lazaro M, Galindo MF, Melero-Fernandez de Mera RM, Fernandez-Gomez FJ, Concannon CG, Segura MF et al. Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activate Bax to induce mitochondrial cytochrome c release and apoptosis in response to malonate. (2007). *Mol Pharmacol* **71**: 736-43.

139. Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. (1996). *Curr Opin Neurobiol* **6**: 667-72.
140. Mattson MP, Culmsee C, Yu ZF. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. (2000). *Cell and Tissue Research* **301**: 173-87.
141. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. (2003). *Gastroenterology* **125**: 1246-57.
142. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. (2008). *Cell* **135**: 1161-3.
143. Henshaw R, Jenkins BG, Schulz JB, Ferrante RJ, Kowall NW, Rosen BR et al. Malonate produces striatal lesions by indirect NMDA receptor activation. (1994). *Brain Res* **647**: 161-6.
144. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. (2009). *Stroke* **40**: e331-9.
145. Andreassen OA, Ferrante RJ, Hughes DB, Klivenyi P, Dedeoglu A, Ona VO et al. Malonate and 3-Nitropropionic Acid Neurotoxicity Are Reduced in Transgenic Mice Expressing a Caspase-1 Dominant-Negative Mutant. (2000). *Journal of Neurochemistry* **75**: 847 -52.
146. Toulmond S, Tang K, Bureau Y, Ashdown H, Degen S, O'Donnell R et al. Neuroprotective effects of M826, a reversible caspase-3 inhibitor, in the rat malonate model of Huntington's disease. (2004). *Br J Pharmacol* **141**: 689-97.
147. Jordan J, Cena V, Prehn JH. Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. (2003). *J Physiol Biochem* **59**: 129-41.
148. Mattson MP, Kroemer G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. (2003). *Trends Mol Med* **9**: 196-205.
149. Reed JC, Kroemer G. Mechanisms of mitochondrial membrane permeabilization. (2000). *Cell Death Differ* **7**: 1145.
150. Vila M, Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. (2003). *Nat Rev Neurosci* **4**: 365-75.
151. Atlante A, Calissano P, Bobba A, Azzariti A, Marra E, Passarella S. Cytochrome c is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent

- fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death. (2000). *J Biol Chem* **275**: 37159-66.
152. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. (2001). *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 63-7.
153. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. (2000). *Nature* **407**: 770-6.
154. Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. (2008). *Autophagy* **4**: 600-6.
155. Puzzo D, Sapienza S, Arancio O, Palmeri A. Role of phosphodiesterase 5 in synaptic plasticity and memory. (2008). *Neuropsychiatr Dis Treat* **4**: 371-87.
156. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. (2006). *Pharmacol Rev* **58**: 488-520.
157. Kukreja RC, Salloum F, Das A, Ockaili R, Yin C, Bremer YA et al. Pharmacological preconditioning with sildenafil: Basic mechanisms and clinical implications. (2005). *Vascul Pharmacol* **42**: 219-32.
158. Bender AT, Beavo JA. Specific localized expression of cGMP PDEs in Purkinje neurons and macrophages. (2004). *Neurochem Int* **45**: 853-7.
159. Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. (1994). *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7583-7.
160. Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. (1993). *Am J Physiol* **265**: C299-303.
161. Guazzi M, Tumminello G, Di Marco F, Fiorentini C, Guazzi MD. The effects of phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil on pulmonary hemodynamics and diffusion capacity, exercise ventilatory efficiency, and oxygen uptake kinetics in chronic heart failure. (2004). *J Am Coll Cardiol* **44**: 2339-48.
162. Kane LB, Klings ES. Present and future treatment strategies for pulmonary arterial hypertension : focus on phosphodiesterase-5 inhibitors. (2006). *Treat Respir Med* **5**: 271-82.

-
163. Reichenberger F, Voswinckel R, Steveling E, Enke B, Kreckel A, Olschewski H et al. Sildenafil treatment for portopulmonary hypertension. (2006). *Eur Respir J* **28**: 563-7.
164. Uthayathas S, Karuppagounder SS, Tamer SI, Parameshwaran K, Degim T, Suppiramaniam V et al. Evaluation of neuroprotective and anti-fatigue effects of sildenafil. (2007). *Life Sci* **81**: 988-92.
165. Soydan G, Sokmensuer C, Kilinc K, Tuncer M. The effects of sildenafil on the functional and structural changes of ileum induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. (2009). *Eur J Pharmacol* **610**: 87-92.
166. Irkorucu O, Ucan BH, Cakmak GK, Emre AU, Tascilar O, Ofluoglu E et al. Does sildenafil reverse the adverse effects of ischemia on ischemic colon anastomosis: yes, 'no'. (2009). *Int J Surg* **7**: 39-43.
167. Beheshtian A, Salmasi AH, Payabvash S, Kiumehr S, Ghazinezami B, Rahimpour S et al. Protective effects of sildenafil administration on testicular torsion/detorsion damage in rats. (2008). *World J Urol* **26**: 197-202.
168. Lledo-Garcia E, Subira-Rios D, Rodriguez-Martinez D, Dulin E, Alvarez-Fernandez E, Hernandez-Fernandez C et al. Sildenafil as a protecting drug for warm ischemic kidney transplants: experimental results. (2009). *J Urol* **182**: 1222-5.
169. Kiyamaz N, Yilmaz N, Mumcu C, Anlar O, Ozen S, Kayaoglu CR. Protective effect of sildenafil (Viagra) in transient spinal cord ischemia. (2008). *Pediatr Neurosurg* **44**: 22-8.
170. Gori T, Sicuro S, Dragoni S, Donati G, Forconi S, Parker JD. Sildenafil prevents endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion via opening of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels: a human in vivo study. (2005). *Circulation* **111**: 742-6.
171. Ockaili R, Salloum F, Hawkins J, Kukreja RC. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. (2002). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**: H1263-9.
172. Salloum F, Yin C, Xi L, Kukreja RC. Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart. (2003). *Circ Res* **92**: 595-7.

173. Das A, Xi L, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling. (2005). *J Biol Chem* **280**: 12944-55.
174. Puerta E, Hervias I, Goni-Allo B, Lasheras B, Jordan J, Aguirre N. Phosphodiesterase 5 inhibitors prevent 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced 5-HT deficits in the rat. (2009). *J Neurochem* **108**: 755-66.
175. Puerta E, Hervias I, Barros-Minones L, Jordan J, Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M et al. Sildenafil protects against 3-nitropropionic acid neurotoxicity through the modulation of calpain, CREB, and BDNF. (2010). *Neurobiol Dis* **38**: 237-45.
176. Orejana L, Barros-Minones L, Jordan J, Puerta E, Aguirre N. Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model. (2012). *Neurobiol Aging* **33**: 625 e11-20.
177. Puzzo D, Staniszewski A, Deng SX, Privitera L, Leznik E, Liu S et al. Phosphodiesterase 5 inhibition improves synaptic function, memory, and amyloid-beta load in an Alzheimer's disease mouse model. (2009). *J Neurosci* **29**: 8075-86.
178. Cuadrado-Tejedor M, Hervias I, Ricobaraza A, Puerta E, Perez-Roldan JM, Garcia-Barroso C et al. Sildenafil restores cognitive function without affecting beta-amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. (2011). *Br J Pharmacol* **164**: 2029-41.
179. Pifarre P, Prado J, Baltrons MA, Giralt M, Gabarro P, Feinstein DL et al. Sildenafil (Viagra) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of multiple sclerosis. (2011). *Acta Neuropathol* **121**: 499-508.
180. Socala K, Nieoczym D, Wyska E, Poleszak E, Wlaz P. Sildenafil, a phosphodiesterase type 5 inhibitor, enhances the antidepressant activity of amitriptyline but not desipramine, in the forced swim test in mice. (2012). *J Neural Transm* **119**: 645-52.
181. Ding G, Jiang Q, Li L, Zhang L, Zhang ZG, Ledbetter KA et al. Magnetic resonance imaging investigation of axonal remodeling and angiogenesis after embolic stroke in sildenafil-treated rats. (2008). *J Cereb Blood Flow Metab* **28**: 1440-8.
182. Li L, Jiang Q, Zhang L, Ding G, Gang Zhang Z, Li Q et al. Angiogenesis and improved cerebral blood flow in the ischemic boundary area detected by MRI after administration of sildenafil to rats with embolic stroke. (2007). *Brain Res* **1132**: 185-92.

-
183. Zhang L, Zhang RL, Wang Y, Zhang C, Zhang ZG, Meng H et al. Functional recovery in aged and young rats after embolic stroke: treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. (2005). *Stroke* **36**: 847-52.
184. Zhang L, Zhang Z, Zhang RL, Cui Y, LaPointe MC, Silver B et al. Tadalafil, a long-acting type 5 phosphodiesterase isoenzyme inhibitor, improves neurological functional recovery in a rat model of embolic stroke. (2006). *Brain Res* **1118**: 192-8.
185. Zhang R. Sildenafil (Viagra) Induces Neurogenesis and Promotes Functional Recovery After Stroke in Rats. (2002). *Stroke* **33**: 2675-80.
186. Zhang RL, Zhang Z, Zhang L, Wang Y, Zhang C, Chopp M. Delayed treatment with sildenafil enhances neurogenesis and improves functional recovery in aged rats after focal cerebral ischemia. (2006). *J Neurosci Res* **83**: 1213-9.
187. Menniti FS, Ren J, Coskran TM, Liu J, Morton D, Sietsma DK et al. Phosphodiesterase 5A inhibitors improve functional recovery after stroke in rats: optimized dosing regimen with implications for mechanism. (2009). *J Pharmacol Exp Ther* **331**: 842-50.
188. Wang L, Gang Zhang Z, Lan Zhang R, Chopp M. Activation of the PI3-K/Akt pathway mediates cGMP enhanced-neurogenesis in the adult progenitor cells derived from the subventricular zone. (2005). *J Cereb Blood Flow Metab* **25**: 1150-8.
189. Zhang R, Wang L, Zhang L, Chen J, Zhu Z, Zhang Z et al. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. (2003). *Circ Res* **92**: 308-13.
190. Kukreja RC, Ockaili R, Salloum F, Yin C, Hawkins J, Das A et al. Cardioprotection with phosphodiesterase-5 inhibition--a novel preconditioning strategy. (2004). *J Mol Cell Cardiol* **36**: 165-73.
191. Wang X, Fisher PW, Xi L, Kukreja RC. Essential role of mitochondrial Ca²⁺-activated and ATP-sensitive K⁺ channels in sildenafil-induced late cardioprotection. (2008). *J Mol Cell Cardiol* **44**: 105-13.
192. Salloum FN, Takenoshita Y, Ockaili RA, Daoud VP, Chou E, Yoshida K et al. Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K(ATP) channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits. (2007). *J Mol Cell Cardiol* **42**: 453-8.

193. Caretti A, Bianciardi P, Ronchi R, Fantacci M, Guazzi M, Samaja M. Phosphodiesterase-5 inhibition abolishes neuron apoptosis induced by chronic hypoxia independently of hypoxia-inducible factor-1alpha signaling. (2008). *Exp Biol Med (Maywood)* **233**: 1222-30.
194. Bednar MM. The role of sildenafil in the treatment of stroke. (2008). *Curr Opin Investig Drugs* **9**: 754-9.
195. Silver B, McCarthy S, Lu M, Mitsias P, Russman AN, Katramados A et al. Sildenafil treatment of subacute ischemic stroke: a safety study at 25-mg daily for 2 weeks. (2009). *J Stroke Cerebrovasc Dis* **18**: 381-3.

Capítulo II

Capítulo 2

Planteamiento y Objetivos

Para tener éxito, la planificación es insuficiente.

Uno debe saber improvisar también.

Isaac Asimov

Estudios recientes han demostrado el potente efecto protector de los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (PDE5i), entre ellos el sildenafil, frente a los daños celulares producidos por procesos isquémicos en distintos órganos. En los últimos años, animados por los resultados obtenidos en otros trastornos neurológicos, numerosos estudios han centrado sus esfuerzos en el potencial efecto neuroprotector del sildenafil en el tratamiento de la isquemia cerebral. Hasta la fecha se ha descrito su papel en la neurogénesis, angiogénesis y la mejora de la función neurológica tras la isquemia cerebral en animales de experimentación. Sin embargo, los mecanismos exactos que median este efecto beneficioso, a día de hoy, no se conocen con exactitud. La comprensión de los mecanismos por los que el sildenafil ejerce sus efectos neuroprotectores en modelos de isquemia cerebral podría tener importantes implicaciones para el tratamiento de esta complicada patología.

El presente trabajo tiene como objetivo general el estudio de las principales cascadas de señalización intracelular implicadas en el efecto neuroprotector ejercido por el sildenafil en la isquemia cerebral. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar el posible efecto neuroprotector del sildenafil en el modelo de hipoxia química inducida por el malonato así como desentrañar los mecanismos responsables de dicha protección. La administración intraestriatal del malonato mimetiza las lesiones provocadas por la isquemia focal e induce la muerte neuronal por mecanismos que incluyen excitotoxicidad, estrés oxidativo y apoptosis; procesos que son trascendentales en la cascada isquémica. En concreto nos propusimos analizar:

1.1. El efecto de la administración del sildenafil sobre el volumen de lesión producido por la administración intraestriatal del malonato. El desarrollo de este objetivo queda reflejado en el capítulo III.

1.2. El efecto del sildenafil sobre el estrés oxidativo inducido por esta toxina. En concreto, se determinará el efecto del sildenafil sobre el aumento en la producción de ROS, así como sobre la activación de la vía de las SAPKs inducida por el malonato. Se estudiará, además, la implicación de JNK y p38 en la

neurotoxicidad ejercida por la toxina mitocondrial, utilizando inhibidores selectivos de ambas proteínas. El desarrollo de este objetivo queda reflejado en el capítulo III.

1.3. El efecto del sildenafil sobre las cascadas intracelulares activadas en respuesta a la excitotoxicidad producida por el malonato. Se valorará la implicación de la calpaína y del complejo p25/cdk5 en la toxicidad del malonato así como el efecto del sildenafil sobre la activación de estas proteínas. El desarrollo de este objetivo queda reflejado en el capítulo IV.

1.4. El efecto del sildenafil sobre la expresión de las proteínas anti-apoptóticas, Bcl-2 y Bcl.xL. El desarrollo de este objetivo queda reflejado en el capítulo IV.

2. Establecer el intervalo de tiempo en el que la administración de sildenafil resulta eficaz en dos modelos de isquemia cerebral.

2.1. Estudio preliminar en un modelo *in vitro* de privación de oxígeno y glucosa (OGD). Se valorará el posible efecto beneficioso del sildenafil cuando es administrado durante la reoxigenación. Este objetivo se desarrolla en el capítulo IV.

2.2. Definición de la ventana terapéutica del sildenafil en el modelo de hipoxia química inducida por el malonato.

Capítulo III

Chapter 3

Modulation of the ASK1-MKK3/6-p38/MAPK signalling pathway mediates sildenafil protection against chemical hypoxia caused by malonate

L Barros-Miñones, L Orejana, B Goñi-Allo, V Suquía, I Hervías, N Aguirre and E Puerta.

British Journal of Pharmacology (en revisión)

Resumen

Antecedentes y finalidad: En los últimos años, los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 han demostrado poseer un potente efecto protector frente a los daños celulares producidos por procesos isquémicos en distintos órganos. Sin embargo, los estudios destinados a conocer su efecto en modelos de isquemia cerebral son escasos. Por tanto, el presente trabajo tiene como objetivo conocer el posible efecto neuroprotector del sildenafil en un modelo de hipoxia química inducido por la toxina mitocondrial malonato. La administración intraestriatal de esta toxina provoca agotamiento energético y lesiones estriatales similares a las producidas por la isquemia focal por mecanismos que comprenden la producción de especies reactivas de oxígeno, ROS.

Enfoque experimental: Se analizó el volumen de lesión mediante la técnica inmunohistoquímica de la citocromo oxidasa. La producción de ROS se determinó por visualización *in situ* de la producción de superóxido y la determinación de los niveles de 3-nitrotirosina. Por último, se midieron los niveles de las proteínas de interés con la técnica de western-blot tras fraccionamiento celular.

Resultados: El sildenafil, administrado 30 min antes del malonato, redujo significativamente los volúmenes de lesión provocados por esta toxina en ratas. Este efecto neuroprotector es independiente de cualquier modificación en la producción de ROS, pero parece derivar de la inhibición de las vías de señalización dependientes de este fenómeno. En concreto, el malonato induce la activación de la proteína cinasa 1 reguladora de la apoptosis, ASK-1; así como de las cinasas MKK7 y MKK3/6; lo que conduce a un aumento en la fosforilación de las MAPKs, JNK y p38. Efectos que fueron bloqueados por el sildenafil. Con el objetivo de determinar la implicación de esta vía de señalización en el efecto neuroprotector del sildenafil, administramos inhibidores selectivos de JNK y p38, SP600125 y SB203580, respectivamente. Mientras que la inhibición de p38 produjo una protección significativa frente a la neurotoxicidad inducida por el malonato, la inhibición de JNK no tuvo ningún efecto beneficioso.

Conclusiones: El sildenafil ejerce un efecto neuroprotector frente a la hipoxia química inducida por el malonato mediante la regulación de la vía de señalización ASK1-MKK3/6-p38/MAPK.

Abstract

Background and purpose: Phosphodiesterase 5 inhibitors have recently been reported to exert beneficial effects against ischemia-reperfusion injury in several organs. However, there are few studies regarding their neuroprotective effects in brain ischemia. The present study was designed to assess the effects of sildenafil against chemical hypoxia induced by malonate. Intrastriatal injection of malonate produces energy depletion and striatal lesions similar to that seen in cerebral ischemia through mechanisms that involve generation of reactive oxygen species (ROS).

Experimental approach: Volume lesion was analysed by cytochrome-oxidase histochemistry. Generation of reactive species was determined by *in situ* visualization of superoxide production and nitrotyrosine measurement. Protein levels were determined by western-blot after subcellular fractionation.

Key results: Sildenafil, given 30 min before malonate, significantly decreased the lesion volume in the rat. This protective effect cannot be attributed to any effect on ROS production but to the inhibition of downstream pathways. Thus, malonate induced the activation of Apoptosis-signal-regulating kinase-1 (ASK1) and two mitogen-activated protein kinase kinases, MKK3/6 and MKK7, which lead to an increased phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 MAPkinase, effects that were blocked by sildenafil. Selective inhibitors of p38 and JNK (SB203580 or SP600125 respectively) were used in combination with malonate in order to evaluate the plausible implication of these pathways in the protection afforded by sildenafil. While inhibition of p38 provided a significant protection against malonate-induced neurotoxicity, inhibition of JNK did not.

Conclusions and implications Sildenafil protects against the chemical ischemia induced by malonate through the regulation of the ASK1-MKK3/6-p38/MAPK signaling pathway.

Keywords:

Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1); Malonate; Mitogen-activated protein kinases (MAPKs); Phosphodiesterase 5 (PDE5); Reactive oxygen species (ROS), Sildenafil.

1. Introduction

Phosphodiesterase 5 (PDE5) is a selective enzyme that catalyzes the breakdown of the cyclic guanosine monophosphate, cGMP (Bender et al., 2006) and has been found in several tissues and some brain regions (Bender et al., 2004). PDE5 inhibitors, such as sildenafil, were initially approved for the treatment of erectile dysfunction and nowadays also for pulmonary arterial hypertension (Galie et al., 2005), due to their vasodilatory effects resulting from the activation of cGMP-dependent protein kinase, PKG (Archer et al., 1994). During the last few years, sildenafil has also been reported to exert beneficial effects against endothelial dysfunction induced by stroke in humans (Gori et al., 2005) and protects against ischemia-reperfusion injury in the heart of rodents (Kukreja et al., 2004; Salloum et al., 2007) and other organs such as the intestine (Soydan et al., 2009), colon (Irkorucu et al., 2009), testicles (Beheshtian et al., 2008), kidney (Lledo-Garcia et al., 2009) or spinal-cord (Kiymaz et al., 2008). Furthermore, in preclinical studies of stroke models with young and aged rats, delayed treatment with PDE5 inhibitors increased neurogenesis, angiogenesis, and synaptogenesis, and improved functional outcomes compared with placebo (Ding et al., 2008; Menniti et al., 2009; Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2006). Based on these findings, safety studies in ischemic stroke patients are being conducted prior to investigating the neurorestorative properties of sildenafil in humans (Silver et al., 2009).

Despite all these evidences, there are very few studies regarding the mechanism underlying the effects exerted by sildenafil in brain ischemic stroke models. The present study was, therefore, undertaken to assess the plausible neuroprotective effects of sildenafil in a model of chemical ischemia. For this, we used malonate, a reversible inhibitor of succinate dehydrogenase (SDH). Intrastratial administration of this mitochondrial toxin produces both energy depletion and striatal lesions that share many features with those that accompany focal ischemia (Schulz et al., 1998). The mechanisms of malonate-induced neuronal cell death comprise the generation of reactive oxygen species, secondary excitotoxicity and apoptosis (Dedeoglu et al., 2002; Greene et al., 1996). Oxidative stress is known to activate specific cell signaling pathways, such as mitogen-

activated protein kinases (MAPKs); which contribute to the cellular damage seen after brain ischemic insults (Saito et al., 2005; Yanagisawa et al., 2008). Among them, c-Jun amino-terminal kinases (JNK) and p38 MAPK, also known as stress-activated protein kinases (SAPKs), have recently been implicated in the toxic effects of malonate as well (Asanuma et al., 2004; Gomez-Lazaro et al., 2007).

Based on these premises, we focused our study on the effects of sildenafil on the intracellular signaling pathways activated by oxidative stress after a malonate-induced chemical hypoxia.

2. Material and Methods

2.1. Drugs and Chemicals

Sodium malonate dibasic monohydrate was from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain); 1-[4-ethoxy-3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo [4,3-d]pyrimidin-5yl) phenylsulfonyl]-4-methylpiperazine citrate (Sildenafil citrate, Viagra™) was from Pfizer and 4-[5-(4-Fluorophenyl)-2-[4-(methylsulphonyl)phenyl]-1H-imidazol-4-yl]pyridine hydrochloride (SB203580 hydrochloride) and Anthra[1-9-cd]pyrazol-6(2H)-one (SP600125) were purchased from Tocris (Biogen Científica S.L., Madrid, Spain).

2.2. Animals, treatments, and experimental design

Experiments were carried out in male Wistar rats (220–270 g; Harlan Iberica, Barcelona, Spain). Rats (four per cage) were housed in constant conditions of humidity and temperature (22 ± 1 °C) with a 12-h/12-h light-dark cycle (lights on at 7:00 h). Food and water were available ad libitum. The experiments were performed after approval of the protocol by the institutional Ethics Committee, in accordance with the law in force (European Directive 86/609/EEC and Real Decreto 1201/2005), following the Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

Rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg i.p.) and placed in a Kopf stereotaxic frame, with the incisor bar set at 3.3 mm below the interaural line. The skull was exposed, bregma pointed, and two holes were drilled at coordinates according to the atlas of Paxinos et al. (1997): +0.6 mm AP, \pm 3 mm ML. Animals were injected with 2 μ l of malonate, SB203580 or SP600125 using a 10- μ l Hamilton syringe with a 26-gauge needle lowered 5.5 mm from the skull. After injection, the needle was left in place for 2 min to allow complete diffusion of the injected volume. The body temperature of the animals was kept constant at 37°C using an electric blanket during surgery and until recovery. Animals were housed individually until they completely recovered from the anaesthesia.

In a first set of experiments, malonate (1.5 μ mol in 2 μ L, pH 7.4-7.6) or phosphate-buffered saline (PBS) was infused into the striatum and animals were sacrificed at different time points (10 min, 30 min, 1, 3, 6 or 9 h) for western blot analysis. In a different set of experiments, rats were orally administered with saline or sildenafil (1.5 mg/kg) 30 min before malonate injection and killed 6 h or 72 h after treatment for western-blot and histochemistry analysis.

Solution of sildenafil was prepared as previously described (Puerta et al., 2010) by grinding Viagra™ tablets into powder and dissolved in distilled water. The drug solution was filtered (0.45 μ m pore size) before oral administration. Dose was chosen to simulate the dose for a patient with 70 kg body weight after orally taking a 20 mg tablet of Viagra™ according to Reagan-Shaw et al. (2008) and is the same dose that has been shown to induce cardioprotection against ischemia-reperfusion injury (Das et al. 2004) and to exert neuroprotective effects against other neurotoxins (Puerta et al. 2009, 2010).

In a different set of experiments, SP600125 (1 nmol in 2 μ L, pH 7.4-7.6 in DMSO 1%) or SB203580 (1 nmol in 2 μ L, pH 7.4-7.6 PBS), alone or in combination with malonate (1.5 μ mol), were injected into the striatum and animals were killed 6 h or 72 h after treatment.

2.3. Cytochrome oxidase histochemistry and analysis of lesion size

Seventy-two h after treatments, rats were killed and brains were frozen immediately on dry ice and then sectioned (25 μ m) on a cryostat. Every second section

throughout the extent of the lesion was mounted on a polylysine-coated slide. Incubation medium consisted of 5 mg cytochrome c and 30 mg 3,3-diaminobenzidine in 50 ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Slides were incubated for 90 min at 37 °C and then removed to 4% neutral, buffered paraformaldehyde for 10 min. Sections were rinsed with distilled water, dehydrated, cleared in xylene, and coverslipped (Goni-Allo et al., 2005). The lesioned area on each section was quantified using a video-based MCID image analysis system (Imaging Research, St. Catharines, Ontario, Canada). Area measurements were summed and multiplied by intersectional distance (50 µm) to determine lesion volume.

2.4. In situ detection of superoxide production

In situ visualization of superoxide production was assessed by hydroethidine histochemistry as previously described (Kim et al., 2002). Rats were administered with sildenafil 30 minutes prior malonate intrastriatal administration. Two h later, 200 µl of PBS containing 1 mg/ml hydroethidine (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 1% DMSO was administered through the carotid artery. Brains were collected 30 min later and frozen on dry ice. Midbrain sections (25 µm thick) were mounted onto gelatin-coated glass slides. Sections were incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Merck, Darmstadt, Germany) in PBS for 15 min in a dark chamber and then were rinsed in distilled H₂O and mounted with Aquamount (Shandon, Pittsburgh, PA). Hydroethidine's oxidation product, ethidium accumulation, was examined by fluorescence microscopy (excitation 510 nm, emission 580 nm) and was quantified using the image analysis software AnalySISD 5.0 (Soft Imaging System, Olympus, Münster, Germany).

2.5. Nitrotyrosine measurement

For nitrotyrosine (NT) measurement, rats were orally administered with saline or sildenafil (1.5 mg/kg) 30 min before malonate injection and were sacrificed 72 h later. Striatal homogenates were prepared in PBS containing a protease inhibitor cocktail set (Calbiochem), 0.5% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS. The homogenates were centrifuged at 10,000 x g for 10 min, and the supernatants were

assayed for NT content using a Nitrotyrosine ELISA Kit (Hycult Biotechnology b.v., Uden, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions.

2.6. Subcellular fractionation and Western blot analysis

For western blot analysis, animals were killed by decapitation; brains were rapidly removed, placed on ice and 2 mm thick tissue section was taken (approximately 1 mm to either side of the injection zone). Striatal tissue was dissected out and fractionated into cytosolic and nuclear fractions according to established protocols (Garcia-Osta et al., 2004; Pallotti et al., 2007; Vijayvergiya et al., 2005), with some modifications. Briefly, tissue were gently homogenized by 20 strokes in a glass-Teflon Potter homogenizer on ice in 200 μ L of buffer A (10 mM Tris, pH 7.4, 320 mM sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, and 1 mg/ml fatty-acid-free bovine serum albumin, BSA) containing phosphatase inhibitors (Phosphatase Inhibitor Cocktail I, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and protease inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail Set I, Animal-Free Aprotinin, Calbiochem, Darmstadt, Germany). Homogenates were then centrifuged at 1500 x g for 5 min at 4 °C. Supernatants were centrifuged at 100,000 x g for 1 h at 4 °C and saved as cytosolic (S100) fractions. Pellets were resuspended in 80 μ L of Buffer B (150mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8.5, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5% Nonidet, 1 mM DTT, containing phosphatase and protease inhibitors) and were centrifuged twice at 1500 x g for 5 min at 4 °C to obtain the nuclear fraction. To verify the relative subcellular purification, each fraction was subjected to Western blotting for Thioredoxin 1 as a cytosolic marker using a rabbit monoclonal antibody anti-Thioredoxin I (2298; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) and Lamin A/C as a nuclear marker using a rabbit monoclonal antibody anti Lamin A/C (2032 Cell Signaling Technology, Beverly, MA).

For DARPP-32 determinations, tissues were homogenized as previously described (Goni-Allo et al., 2008) to obtain whole cell extracts. Finally, protein was determined by Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Proteins (20 μ g) were separated by electrophoresis on a sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel under reducing conditions. Membranes were probed using anti-DARPP-32 (AB1656, Chemicon, Millipore, Billerica, MA, USA); anti-p38 MAPK, anti-pASK1 (ser 83), anti-p-cjun (ser63), anti-JNK (56G8), anti-pJNK, anti-Lamin A/C, anti-pMKK3/MKK6, anti-

pMKK7 (9212, 3761, 9261, 9258, 9251, 2032, 9231, 4171 respectively, Cell Signaling Technology, Beverly, MA); anti-pp38 MAPK (1229-1; Epitomics, Burlingame, CA) 1/1000 dilution or anti- β -actin monoclonal antibody (A1978; Sigma, Madrid, Spain) 1/10000 dilution. Blots were visualized using a chemiluminescence ECL Western blotting detection reagent (Amersham, Buckinghamshire, England). Band intensity was estimated densitometrically on a GS-800 calibrated densitometer (Biorad One). Note that blots were stripped and re-probed when necessary.

2.7. Data Analysis

Results were expressed as mean \pm S.E.M. Comparisons among groups were made using Student's t-test or one-way analysis of variance followed by Tukey test for multiple group comparisons. 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). Experiments were carried out in 16 male SAMP8 and 16 SAMR1 mice (30–35 g, 6 months old at the beginning of treatment). A pilot study was also carried out in 16 male SAMP8 and 16 SAMR1 mice (31–35 g, 9 months old at the beginning of treatment). Animals were 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. All efforts were made to minimise animal suffering, and to reduce the number of animals. Behavioral experiments were conducted between 9:00 a.m. and 1:00 p.m. Animals were randomly assigned to control and treatment groups ($n = 8$ per group age, genotype and treatment).

3. Results

3.1. Sildenafil prevents striatal lesions caused by malonate independent of ROS generation

To investigate the neuroprotective effects of sildenafil against neuronal death-induced by malonate, rats were administered with sildenafil (1.5 mg/kg p.o.) 30 min before striatal stereotaxic injections of 1.5 μ mol of malonate. Seventy-two h later, rats were killed and tissue was prepared for histochemistry and western blot analysis. As shown in Fig. 1A, malonate produced a large striatal lesion which was reverted by sildenafil. Protective effect of this PDE5 inhibitor was further confirmed by Western blot analysis of striatal DARPP-32 protein levels. DARPP-32 is a marker of medium spiny GABAergic neurons, the dominant population of neurons in the striatum and the most vulnerable to excitotoxic lesions (Martinez-Serrano et al., 1996). As depicted in figure 1B, malonate produced a consistent loss of striatal DARPP-32 protein levels that was significantly prevented by sildenafil.

It has been suggested that ROS generation by malonate plays a key role in the mechanisms underlying neurotoxicity (Fernandez-Gomez et al., 2005). We hypothesized, therefore, that protection afforded by sildenafil could be due to the inhibition of ROS production. Analysis of superoxide radical production using hydroethidine in situ detection revealed that in saline-injected rats, striatal superoxide and superoxide-derived oxidant production was minimal (Data not shown). In contrast, ethidium fluorescence was increased 2.5 h after malonate injection, an effect not prevented by sildenafil (Fig. 1C). This was further confirmed when striatal levels of NT, a highly reactive anion formed in the reaction of nitric oxide with superoxide radicals (Ischiropoulos et al., 1995), were measured 72 h after malonate injections (Fig. 1D).

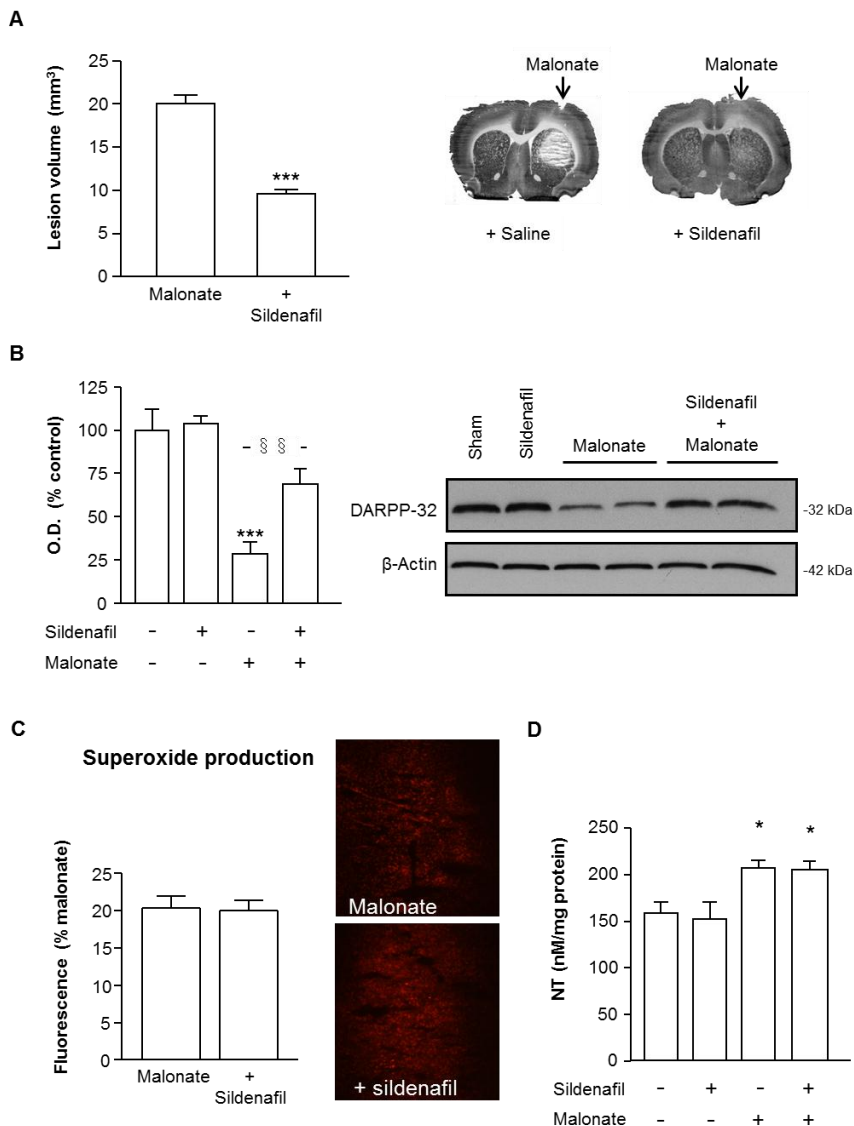


Figure 1. Neuroprotective effect of sildenafil against malonate injection. Sildenafil (1.5 mg/kg p.o.) was administered 30 min before intrastriatal administration of malonate (1.5 μ mol/2 μ l). Rats were killed 72 h later. **Panel A.** Representative cytochrome oxidase-stained slices and quantification of malonate-induced striatal lesions (mm³) show that the neurotoxic effect of malonate is attenuated by sildenafil. Data are mean \pm S.E.M (n=9-13 animals per group). [t (20)=6.233, P<0.001]. **Panel B.** Quantitative measurement of DARPP-32 levels and representative western blots showing DARPP-32 protein bands at 32 kDa. β -actin was used as equal loading control. Data are mean \pm S.E.M (n=5-8 animals per group). [F(3,20)=7.516, P<0.01]. ***P< 0.001 vs. sham, §§P< 0.01 vs. malonate. **Panel C.** Effect of sildenafil on malonate induced superoxide production. Quantitative measurement of fluorescence levels (bottom) and representative photomicrographs showing fluorescent ethidium signals (red) in the striatum 2.5 h after malonate injection. **Panel D.** Effect of sildenafil on malonate-induced nitrotyrosine (NT) formation in the striatum 72 h after treatments. Results are mean \pm SEM, n=5-8. Statistical analysis yielded the following result: [F(3,23)=5.726;P< 0.01]. Different from the corresponding sham group: *P<0.05.

3.2. Malonate activates the ASK1/MAPKKs pathway: Effect of sildenafil

As sildenafil failed to block malonate-induced ROS production, we wondered whether sildenafil could be modulating ROS activation of the SAPKs pathway. Recent studies have shown that ASK1 is selectively required for sustained activation of the p38 and JNK SAPK induced by oxidative stress (Tobiome et al., 2001). Among the variety of ASK1 regulators, Akt is known to phosphorylate ASK1 on the serine 83, which is associated with a decrease in its kinase activity (Kim et al., 2001). Since sildenafil has been shown to activate Akt (Puerta et al., 2009) we investigated the phosphorylation status of ASK1 at ser83. Western blot analysis showed that malonate significantly decreased the inhibitory phosphorylation of ASK1, effect that was prevented by sildenafil (Fig. 2A).

Once activated, ASK1 phosphorylates the mitogen-activated protein kinase kinases MKK7 and MKK3/MKK6, which, in turn, promote JNK and p38 kinase activities, respectively (Ichijo, 1997). As shown in Fig. 2B, levels of p-MKK3/6 and p-MKK7 were significantly increased 6 hours after malonate administration, an effect that was significantly decreased by sildenafil.

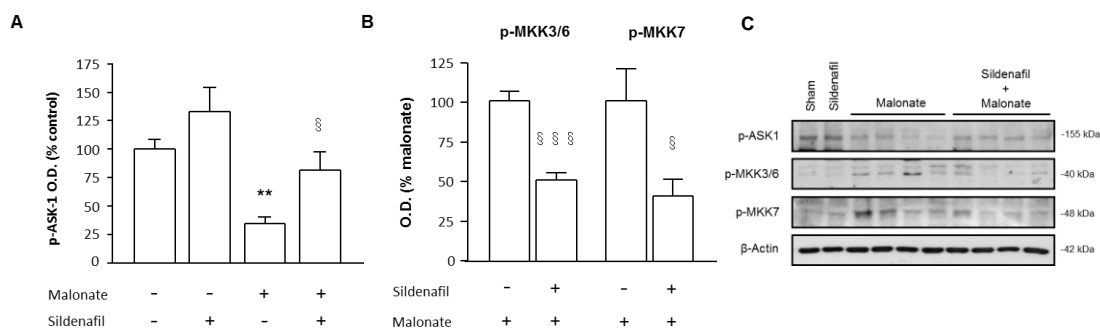


Figure 2. ASK1 activation is inhibited by sildenafil. **Panel A.** Quantitative measurements of optical density (O.D.) of p-ASK1 (ser83). [F(3,21)=9.505;P< 0.001]. **Panel B.** Quantitative measurements of western blot analysis of the phosphorylation status of the p38-activating kinases MKK3 and MKK6 and the JNK-activating kinase MKK7. Note that values from sham and sildenafil groups were so weak that were not taken into account for quantitative measurement. Statistical analysis yielded the following results: for p-MKK3/6 [t(12)=6.778;P< 0.001] and p-MKK7 [t(10)=2.829;P<0.05]. Results are mean±SEM, n=5-8. Different from the corresponding sham group: **P<0.01. Different from malonate-only animals: \$P<0.05; \$\$P<0.001. **Panel C.** Representative blots showing that sildenafil reverted malonate-induced alterations on the phosphorylation status of ASK-1, MKK3/6 and MKK7.

3.3. Time-course activation of SAPKs pathway after malonate

Based on our results and those reported by others (Asanuma et al., 2004; Gomez-Lazaro et al., 2007), we examined the time course activation of JNK and p38 after malonate injections in nuclear and cytosolic fractions.

p38 MAPK is activated following phosphorylation at Thr180/Tyr182 by upstream MAPKs. Upon activation, it translocates to the nucleus where it interacts with its targeted transcription factors (Raingeaud et al., 1996). As shown in Figure 3A, malonate activated p38 in a time-dependent manner. In particular, p-p38 and total p38 levels were significantly decreased in the cytosolic fraction by 30 minutes after malonate injections whereas the opposite was found in the nuclear fraction, remaining above control levels up to 9 h later. On the other hand, the activation of JNK (54 and 46 kDa), measured as a significant increase in the ratio between the phosphorylated and the unphosphorylated forms of JNK, was not evident until 3 h after malonate injection remaining significantly high for at least 6 more hours (Fig. 3B). Figure 3C shows a representative blot used to assess the purity of our samples.

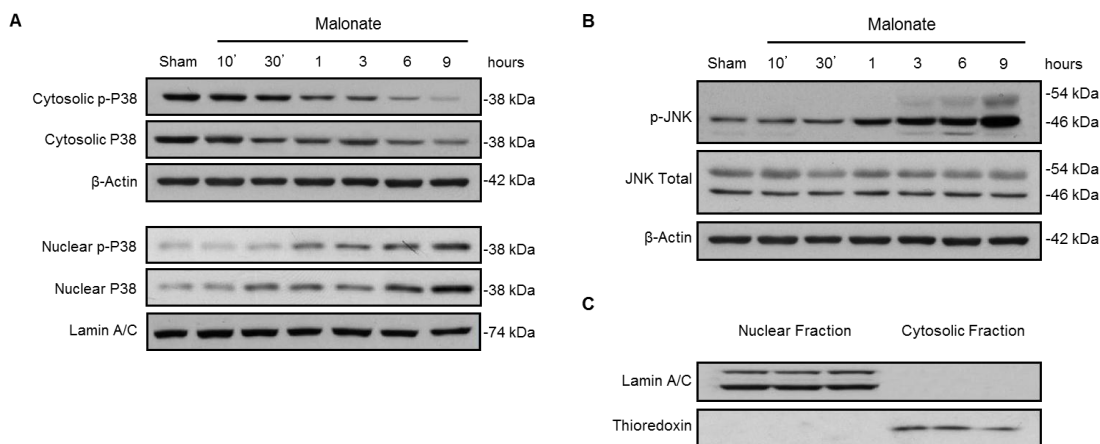


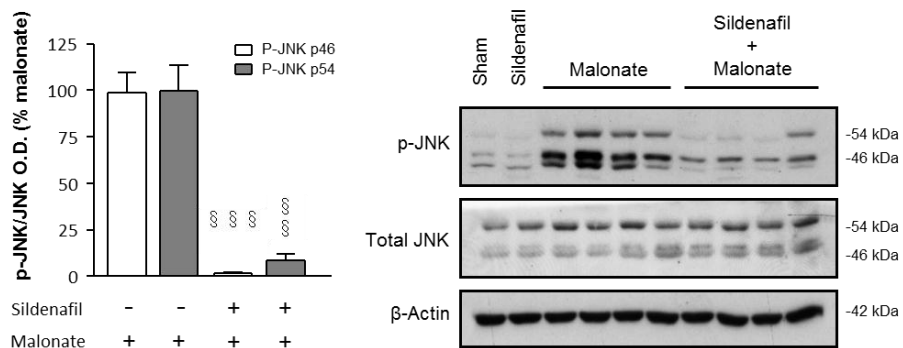
Figure 3. Time course activation of SAPK induced by malonate. Animals were sacrificed at different time points after intrastriatal injection of malonate (1.5 μmol/ 2 μl). Panel A. Malonate induces p38 translocation to the nucleus in a time dependent manner. Representative Western blots of cytosolic and nuclear fractions. β-actin and lamin A/C were used as equal loading control. (n= 5 per group). Panel B. Representative Western blots showing the time course expression levels of p-JNK in the cytosol after malonate administration. (n= 5 per group). Panel C: Representative blots showing the purity of our samples.

3.4. Effect of sildenafil on JNK activation induced by malonate

As MAPKs are activated in response to malonate, we next investigated whether sildenafil neuroprotection affected the activation of these pathways. In this case, we administered sildenafil 30 minutes prior to malonate injection and rats were killed 6 hours later because we had previously observed a sustained increase of both, p38 and JNK, at this time point.

We first focused on JNK activation and found that sildenafil almost completely reversed the phosphorylation of JNK (Fig. 4A). Within the nucleus, activated JNK controls the phosphorylation state of c-Jun as well as its transcriptional function (Bogoyevitch et al., 2006). As expected, using a specific antibody for the phosphorylated form of c-Jun (p-c-Jun ser 63), we detected a significant activation of this transcription factor 6 h after malonate that was also reduced by sildenafil (Fig. 4B).

A



B

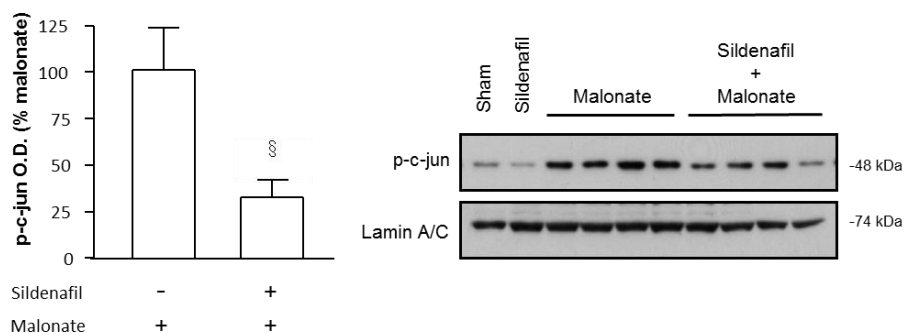


Figure 4. Sildenafil reverses JNK activation caused by malonate. Sildenafil (1.5 mg/kg p.o.) was administered 30 min before malonate injection (1.5 μ mol/2 μ l) and rats were killed 6 h later. **Panel A.** Quantitative measurement of p-JNK/JNK levels and representative western blots showing that sildenafil inhibits the phosphorylation of JNK (46 and 54 kDa) induced by malonate. Note that the levels of p-JNK from sham and sildenafil groups were so weak that were not taken into account for statistical analysis. Data are means \pm SEM (n=5-9 animals for each group). Data analyzed by t student revealed significant differences: for p-JNK 46 kDa [t(12)=12.77, P<0.001] and for p-JNK 54 kDa [t(12)=8.330, P<0.01]. **Panel B.** Sildenafil inhibits the increase in c-jun phosphorylation at ser 63 shown in nuclear fractions. Data are mean \pm S.E.M (n=6 animals per group) [t(11)=2.950, P<0.05]. \S P< 0.05, $\S\S$ P< 0.01, $\S\S\S$ P<0.001 vs. malonate.

3.5. JNK inhibition does not protect against malonate-induced cell death

In parallel experiments we investigated whether the inhibition of JNK would result in a corresponding decrease of malonate neurotoxicity. For this, rats were treated with the reversible ATP competitive JNK inhibitor, SP600125 (1 nmol/2 μ L), in combination with malonate. As seen in figure 5A, the administration of SP600125 resulted in a significant decrease of both p-JNK and p-cjun, indicating an effective blockage of JNK activity. This effect, however, was not accompanied by any reduction on the infarct size induced by malonate (Fig. 5B). Furthermore, no effect on p38 translocation to the nucleus was either observed (Fig. 5C and 5D).

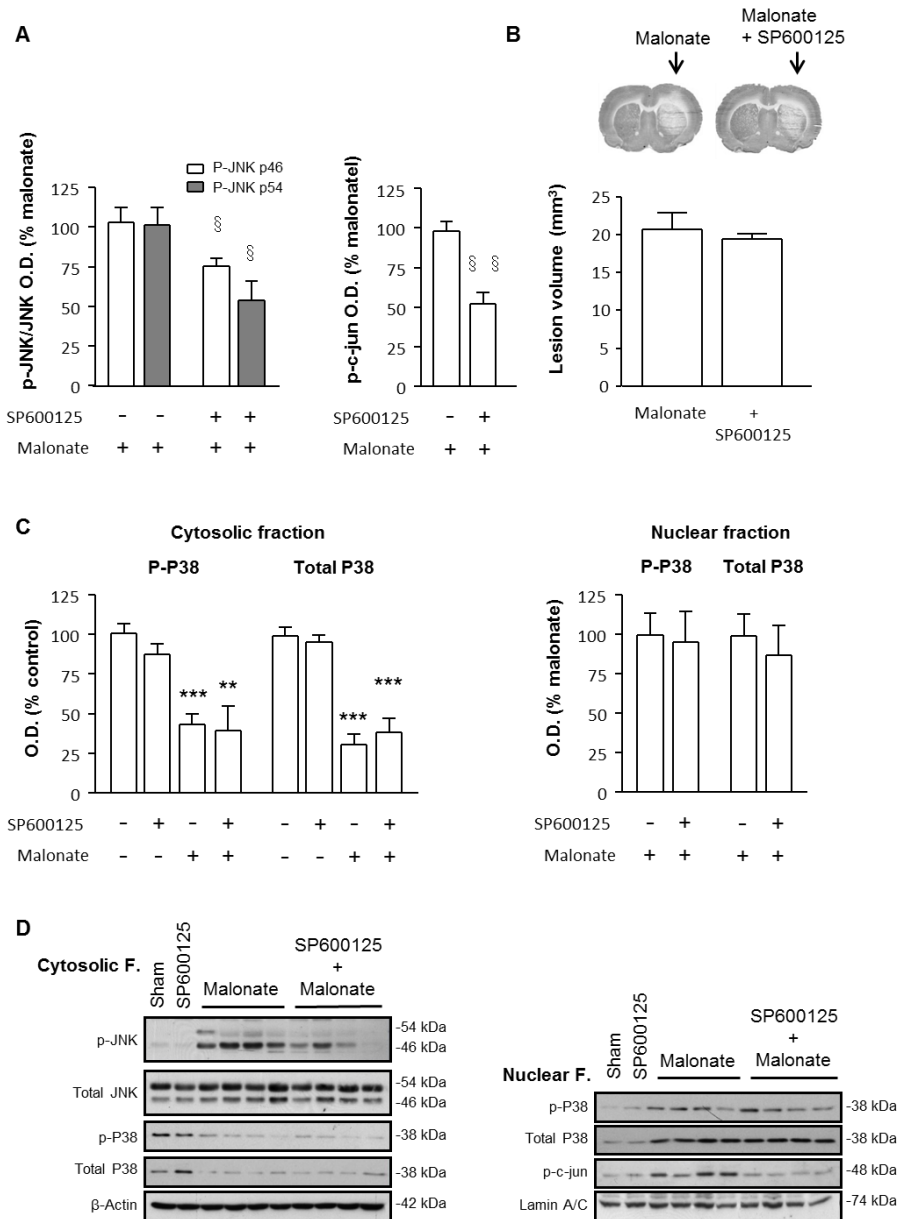


Figure 5. Effect of the JNK inhibitor, SP600125, on malonate induced neurotoxicity. SP600125 (1 nmol/2 μ l) was administered intrastrially in combination with malonate (1.5 μ mol/2 μ l). **Panel A.** Quantitative measurement of optical density showing that SP600125 produced a half/significant decrease in JNK and c-jun phosphorylation caused by malonate. Data are mean \pm S.E.M. (n=5-8). Data analyzed by t student revealed significant differences: for p-JNK 46 kDa [t(8)=2.565, P<0.05], for p-JNK 54 kDa [t(9)=2.721, P<0.05] and for p-c-jun [t(10)=4.544, P<0.05]. **Panel B.** Representative cytochrome oxidase-stained slices and quantification of malonate-induced striatal lesions (mm³) show that SP600125 failed to inhibit the neurotoxic effect of malonate observed 72 h after treatment. **Panel C.** SP600125 had no effect on p38 translocation to the nucleus. **Panel D.** Representative blots from nuclear and cytosolic fractions showing the effects of SP600125 on malonate-induced activation of the SAPK pathway 6 h after treatment.

3.6. Effect of sildenafil on p38 activation induced by malonate

We next investigated the effect of sildenafil on the activation of p38 observed after malonate injection. As described before, sildenafil was administered 30 minutes prior to malonate and rats were killed 6 hours later. As shown in figure 6, sildenafil prevented p38 and p-p38 reductions in the cytosol by inhibiting their translocation to the nucleus.

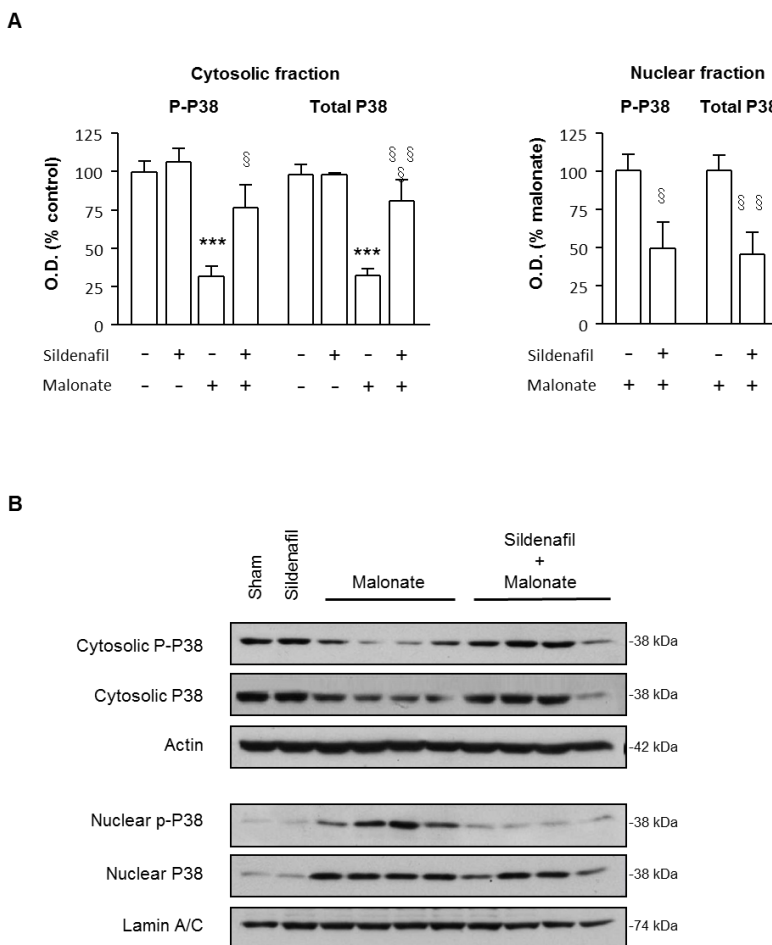


Figure 6. Sildenafil reverses p38 activation caused by malonate. Sildenafil (1.5 mg/kg p.o.) was administered 30 min before malonate injection (1.5 μ mol/2 μ l) and rats were killed 6 h later. **Panel A.** Quantitative measurement of p-p38 and p38 levels in both cytosolic and nuclear fractions. Note that nuclear values from sham and sildenafil groups were so weak that were not taken into account for statistical analysis. Data are mean \pm S.E.M (6-9). Statistical analysis yielded the following results: for cytosolic p-p38 [F(3,31)=12.73;P< 0.001] and total p38 [F(3,31)=17.81;P<0.001], for nuclear p-p38 [t(13)=2.224,P<0.05] and total p38 [t(11)=3.038,P<0.01]. ***P<0.001 vs. sham; §P< 0.05, §§P< 0.01, §§§P<0.001 vs. malonate. **Panel B.** Representative blots from nuclear and cytosolic fractions showing that sildenafil blocks p38 translocation induced by malonate.

3.7. Malonate neurotoxicity is mediated via p38 MAPK

The significance of p38 MAPK activation in malonate neurotoxicity was confirmed by administering SB203580, a highly specific inhibitor of p38 MAPK (Cuenda et al., 1995). Treatment with SB203580 (1 nmol/2 μ L) significantly decreased the histological lesion caused by malonate (Fig. 7A). Of notice, SB203580 not only inhibited p38 activity but also blocked the phosphorylation of JNK and c-jun caused by malonate (Fig. 7B). These results not only support the key role of p38 translocation in malonate neurotoxicity but also point to its inhibition by sildenafil as a plausible mechanism underlying its cytoprotective effects.

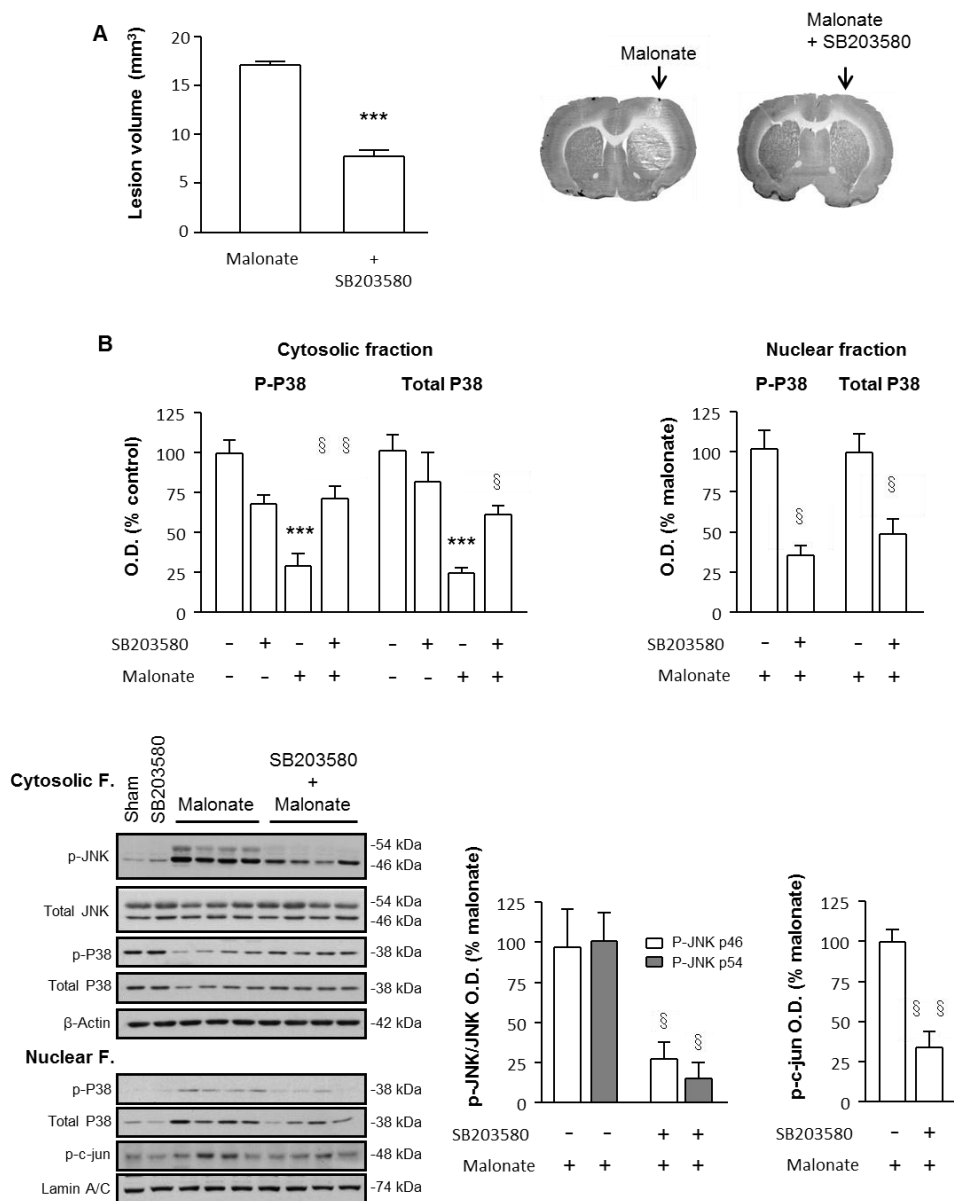


Figure 7. Activation of p38 is involved in malonate induced cell death. Rats were administered intrastriatally with malonate (1.5 μmol/2 μl) alone or in combination with the p38 inhibitor, SB203580 (1 nmol/2 μl). **Panel A.** Representative cytochrome oxidase-stained slices and quantification of malonate-induced striatal lesions (mm³) showing that SB203580 significantly inhibited the neurotoxic effect of malonate 72 h after treatment. Data are mean±S.E.M. (n=6) [t(11)=12.89;P<0.001]. **Panel B.** Quantitative measurements and representative blots showing that SB203580 inhibited not only p38 activation but also the activation of the JNK pathway induced by malonate. For this, rats were killed 6 h after treatment. Statistical analysis yielded the following results: for cytosolic p-p38 [F(3,30)=13.29;P<0.001] and total p38 [F(3,20)=16.60;P<0.001], for nuclear p-p38 [t(12)=5.319;P<0.05] and total p38 [t(12)3.409; P<0.05], for p-JNK/JNK (46kDa) [t(11)=2.531;P<0.05] and p-JNK/JNK (54kDa) [t(11)=4.591;P<0.05] and for p-c-jun [t(8)=5.292;P<0.01]. Different from the corresponding sham group: ***P<0.001. Different from malonate-only animals: §P<0.05; §§P<0.01.

4. Discussion

Neuroprotective effects of PDEi have been described in several models of neurological disorders such as Parkinson's disease (Picconi et al., 2011; Tozzi et al., 2012); Alzheimer's disease (Cuadrado-Tejedor et al., 2011) and mitochondrial neurotoxicity (Puerta et al., 2010). In addition, they improve striatal synaptic plasticity in physiological conditions (Calabresi et al., 1999). Lately, and encouraged by the results obtained in other organs, new studies are focusing on the potential role of sildenafil, and other PDE5 inhibitors, in the treatment of cerebral ischemia. Indeed, recent reports have shown that sildenafil improves the outcome of rats after stroke by enhancing angiogenesis, neurogenesis and improving neurologic function (Ding et al., 2008; Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2006).

Intrastriatal administration of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor, malonate, in rats closely mimics some of the main pathologic features of focal ischemia (Schulz et al., 1998). The mechanisms leading to neuronal death in this model involve secondary excitotoxicity, generation of ROS and apoptosis (Dedeoglu et al., 2002; Greene et al., 1996). In the present study we demonstrated that sildenafil, given at a dose comparable to that used in humans and administered 30 minutes before malonate injection, attenuated striatal toxicity. Under our experimental conditions, malonate produced histological lesions, assessed by cytochrome oxidase histochemistry, and a consistent loss of striatal DARPP-32 levels, effects that were significantly prevented by sildenafil.

Oxidative stress has long been considered as the major cause of tissue injury after cerebral ischemia (Saito et al., 2005) and is considered to play key role in malonate-induced neurotoxicity (Fernandez-Gomez et al., 2005). In an attempt to understand the mechanisms underlying the protective effects afforded by sildenafil, we analysed the effect of this PDE5 inhibitor on ROS production. As expected, malonate increased ROS production but, in contrast to previous reports (Bivalacqua et al., 2009; Koupparis et al., 2005; Muzaffar et al., 2005, Puerta et al. 2012) sildenafil failed to prevent malonate-induced rise in ROS production. Furthermore, sildenafil also failed to reduce the increased NT

concentrations found 72 h after malonate. Fernandez-Gomez et al. (2005) have suggested that malonate requires minutes to disrupt mitochondrial redox status. This fast and excessive production of reactive oxygen species could overwhelm sildenafil antioxidant capacity when the PDE5i is given shortly before malonate administration.

Upon ROS formation, many intracellular pathways are activated. Among them, ASK1 is selectively required for sustained activation of the SAPKs pathway induced by oxidative stress (Sekine et al., 2006; Tobiume et al., 2001). The activity of this kinase can be regulated by a number of different ASK1-interacting proteins (Hattori et al., 2009; Hsieh et al., 2006). For instance, phosphorylation of ASK1 on Ser83, negatively regulates its proapoptotic function and, in turn, leads to the enhancement of cell survival (Kim et al., 2001). Our results show that malonate decreases the inhibitory phosphorylation of ASK1, which can indirectly indicate an increase on its activity. By contrast, sildenafil treated animals kept the levels of inactive ASK1 similar to those found in the sham group. Our group and others have previously shown that sildenafil increases Akt phosphorylation in the brain (Puerta et al., 2009; Wang et al., 2005), an effect that depends on the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signal transduction pathway. Akt is a serine/threonine kinase known to phosphorylate ASK1 on ser83 and therefore, although not directly addressed in this work, the PI3k/Akt/Ask1 pathway could account for the protection afforded by sildenafil against malonate.

Once activated, ASK1 can selectively activate JNK and p38 MAP kinases, leading to neuronal death through the activation of different mitogen-activated protein kinase kinases, MAPKs (Hattori et al., 2009). MKK3 and MKK6 are the main MAPKs that phosphorylate and activate p38 MAPK (Enslin et al., 1998); whereas MKK7 is responsible for JNK activation (Bogoyevitch et al., 2006). We therefore analysed the phosphorylation levels of MKK3/6 and MKK7 after malonate and found they were significantly increased. Of notice, sildenafil inhibited the activation of MKK3/6 and MKK7 induced by malonate possibly as a consequence of ASK1 inhibition.

MAPKs play important roles in cellular response to different stimuli (Cowan, 2003). Among the MAPKs, JNK and p38, are often implicated in cell death (Xia et al., 1995). A

growing body of evidence has demonstrated that JNK and p38 are activated following cerebral ischemia and contribute to ischemic neuronal death (Borsello et al., 2003; Irving et al., 2002; Toledo-Pereyra et al., 2008). Recently, JNK and p38 have also been implicated in the toxic effects of malonate (Asanuma et al., 2004; Gomez-Lazaro et al., 2007). Taken this into account and based on our previous results, we focused on the plausible role of SAPKs inhibition in the neuroprotective effects of sildenafil against chemical hypoxia caused by malonate. We addressed this issue, by analysing the activation pattern of JNK and p38 following malonate administration. We observed an important activation of p38 which translocates to the nucleus within the first few minutes. Although starting later, we also confirmed that malonate induces the phosphorylation of JNK that, as well as p38, remains activated up to 9h after malonate. Noteworthy, sildenafil inhibited the activation of both SAPKs. Furthermore, sildenafil prevented the activation of c-jun, a downstream effector of JNK implicated in stress responses and apoptosis (Behrens et al., 1999). Although some authors have suggested that p38 phosphorylation could be mediating the angiogenic effects of sildenafil (Pyriochou et al., 2007) our findings are in line with the observations of Caretti et al. (2008), who reported that sildenafil prevents p38 phosphorylation in a model of chronic hypoxia and also with the results reported by Zhao et al. (2011) showed that sildenafil inhibits the activation of both JNK and p38 caused during lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response *in vitro*.

In order to elucidate the implication of SAPKs inhibition on the protection triggered by sildenafil, we next studied the effect of SP600125 and SB203580, selective inhibitors of JNK and p38 respectively. Interestingly, the administration of the reversible ATP competitive inhibitor of JNK, SP600125, (Bennett et al., 2001) failed to protect the cellular loss caused by malonate. These data suggest that, at least in this context, JNK activation and subsequent c-jun phosphorylation is not relevant in malonate induced cell death. Otherwise, the importance of p38 activation in malonate neurotoxicity was confirmed using the selective inhibitor SB203580, as it significantly reduced the infarct size. Of note, SB203580 also reduced the activation of JNK and c-jun induced by malonate. This reduction could be attributed to a side effect of SB203580, as it was previously described that high doses of this inhibitor can affect JNK activation (Whitmarsh et al., 1997). As reviewed by

(2008), MAPK pathways are not independent from each other but contain a series of overlapping signaling mechanism. Therefore, although not described before, we cannot preclude a possible crosstalk between p38 and JNK in this model.

In conclusion, our findings show that sildenafil exerts neuroprotection against a chemical ischemia induced by the mitochondrial toxin, malonate, in rats. This protective effect is independent of any change in ROS production but appears to be related to an inhibition of the ASK1-MKK3/6-p38 pathway (Fig. 8). Future studies using other animal models of stroke are warranted to exploit the possible therapeutic potential of sildenafil in preventing neuronal cell death following ischemia/reperfusion.

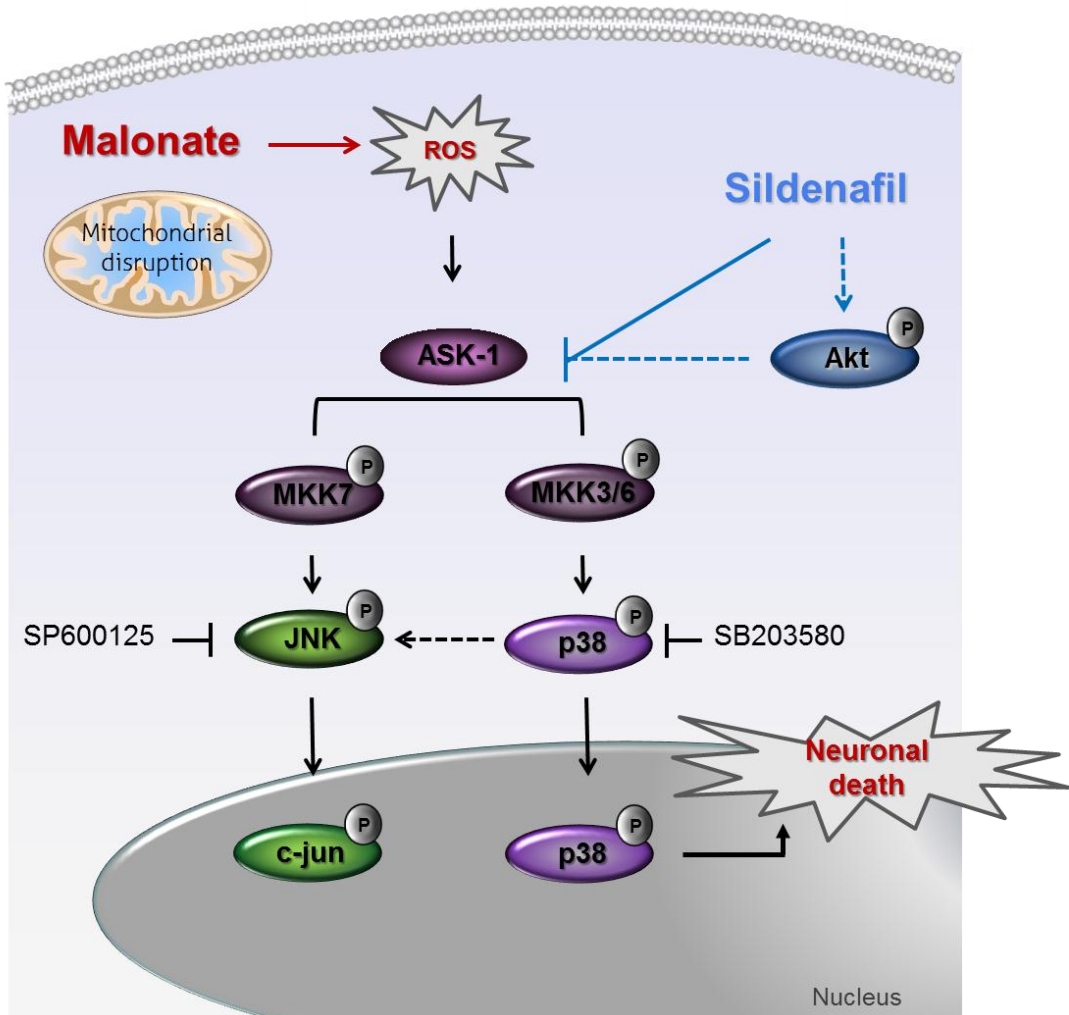


Figure 8. Proposed mechanisms underlying sildenafil neuroprotection against malonate induced neurotoxicity. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonate administration induces mitochondrial dysfunction, which triggers the generation of reactive oxygen species (ROS). The increase in ROS production leads to the activation of ASK1, which, in turn, activates JNK and p38. Nuclear translocation of p38 contributes to neuronal death. Sildenafil afforded protection is independent of any change in ROS production but appears to be related to the inhibition of the ASK1-MKK3/6-p38 pathway.

Acknowledgements

The authors are grateful to Sandra Lizaso and Mari Luz Muro for technical assistance. They would also like to thank “Amigos de la Universidad de Navarra” for a fellowship to L.O. and L.B-M and Ramon Areces Foundation for a fellowship to E.P. This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-05143-C03-03).

Disclosure statement

None of the authors have any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the work submitted that could inappropriately influence their work.

References

- Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK (1994). Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(16): 7583-7587.
- Asanuma T, Inanami O, Tabu K, Waki K, Kon Y, Kuwabara M (2004). Protection against malonate-induced ischemic brain injury in rat by a cell-permeable peptidic c-Jun N-terminal kinase inhibitor, (L)-HIV-TAT48-57-PP-JBD20, observed by the apparent diffusion coefficient mapping magnetic resonance imaging method. *Neurosci Lett* 359(1-2): 57-60.
- Beheshtian A, Salmasi AH, Payabvash S, Kiumehr S, Ghazinezami B, Rahimpour S, et al. (2008). Protective effects of sildenafil administration on testicular torsion/detorsion damage in rats. *World J Urol* 26(2): 197-202.
- Behrens A, Sibilila M, Wagner EF (1999). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21(3): 326-329.
- Bender AT, Beavo JA (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58(3): 488-520.
- Bender AT, Beavo JA (2004). Specific localized expression of cGMP PDEs in Purkinje neurons and macrophages. *Neurochem Int* 45(6): 853-857.
- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, et al. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 13681-13686.
- Bivalacqua TJ, Sussan TE, Gebaska MA, Strong TD, Berkowitz DE, Biswal S, et al. (2009). Sildenafil inhibits superoxide formation and prevents endothelial dysfunction in a mouse model of secondhand smoke induced erectile dysfunction. *J Urol* 181(2): 899-906.

- Bogoyevitch MA, Kobe B (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(4): 1061-1095.
- Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, et al. (2003). A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med* 9(9): 1180-1186.
- Boutros T, Chevet E, Metrakos P (2008). Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev* 60(3): 261-310.
- Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, Sancesario G, Morello M, Giorgi M, et al. (1999). A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *J Neurosci* 19(7): 2489-2499.
- Caretti A, Bianciardi P, Ronchi R, Fantacci M, Guazzi M, Samaja M (2008). Phosphodiesterase-5 inhibition abolishes neuron apoptosis induced by chronic hypoxia independently of hypoxia-inducible factor-1 α signaling. *Exp Biol Med (Maywood)* 233(10): 1222-1230.
- Cowan KJ (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *Journal of Experimental Biology* 206(7): 1107-1115.
- Cuadrado-Tejedor M, Hervias I, Ricobaraza A, Puerta E, Perez-Roldan JM, Garcia-Barroso C, et al. (2011). Sildenafil restores cognitive function without affecting beta-amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* 164(8): 2029-2041.
- Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, et al. (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 364(2): 229-233.

- Dedeoglu A, Ferrante RJ, Andreassen OA, Dillmann WH, Beal MF (2002). Mice Overexpressing 70-kDa Heat Shock Protein Show Increased Resistance to Malonate and 3-Nitropropionic Acid. *Exp Neurol* 176(1): 262-265.
- Ding G, Jiang Q, Li L, Zhang L, Zhang ZG, Ledbetter KA, et al. (2008). Magnetic resonance imaging investigation of axonal remodeling and angiogenesis after embolic stroke in sildenafil-treated rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 28(8): 1440-1448.
- Enslin H, Raingeaud J, Davis RJ (1998). Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* 273(3): 1741-1748.
- Fernandez-Gomez FJ, Galindo MF, Gomez-Lazaro M, Yuste VJ, Comella JX, Aguirre N, et al. (2005). Malonate induces cell death via mitochondrial potential collapse and delayed swelling through an ROS-dependent pathway. *Br J Pharmacol* 144(4): 528-537.
- Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, et al. (2005). Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 353(20): 2148-2157.
- Garcia-Osta A, Del Rio J, Frechilla D (2004). Increased CRE-binding activity and tryptophan hydroxylase mRNA expression induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") in the rat frontal cortex but not in the hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 126(2): 181-187.
- Gomez-Lazaro M, Galindo MF, Melero-Fernandez de Mera RM, Fernandez-Gomez FJ, Concannon CG, Segura MF, et al. (2007). Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activate Bax to induce mitochondrial cytochrome c release and apoptosis in response to malonate. *Mol Pharmacol* 71(3): 736-743.

- Goni-Allo B, Puerta E, Mathuna BO, Hervias I, Lasheras B, de la Torre R, et al. (2008). On the role of tyrosine and peripheral metabolism in 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology* 54(5): 885-900.
- Goni-Allo B, Ramos M, Jordan J, Aguirre N (2005). In vivo studies on the protective role of minocycline against excitotoxicity caused by malonate or N-methyl-d-aspartate. *Exp Neurol* 191(2): 326-330.
- Gori T, Sicuro S, Dragoni S, Donati G, Forconi S, Parker JD (2005). Sildenafil prevents endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion via opening of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels: a human in vivo study. *Circulation* 111(6): 742-746.
- Greene JG, Greenamyre JT (1996). Manipulation of membrane potential modulates malonate-induced striatal excitotoxicity in vivo. *J Neurochem* 66(2): 637-643.
- Hattori K, Naguro I, Runchel C, Ichijo H (2009). The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases. *Cell Commun Signal* 7: 9.
- Hsieh CC, Papaconstantinou J (2006). Thioredoxin-ASK1 complex levels regulate ROS-mediated p38 MAPK pathway activity in livers of aged and long-lived Snell dwarf mice. *FASEB J* 20(2): 259-268.
- Ichijo H (1997). Induction of Apoptosis by ASK1, a Mammalian MAPKKK That Activates SAPK/JNK and p38 Signaling Pathways. *Science* 275(5296): 90-94.
- Irkorucu O, Ucan BH, Cakmak GK, Emre AU, Tascilar O, Ofluoglu E, et al. (2009). Does sildenafil reverse the adverse effects of ischemia on ischemic colon anastomosis: yes, 'no'. *Int J Surg* 7(1): 39-43.
- Irving EA, Bamford M (2002). Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22(6): 631-647.

- Ischiropoulos H, al-Mehdi AB (1995). Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett* 364(3): 279-282.
- Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV (2001). Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 21(3): 893-901.
- Kim GW, Chan PH (2002). Involvement of superoxide in excitotoxicity and DNA fragmentation in striatal vulnerability in mice after treatment with the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J Cereb Blood Flow Metab* 22(7): 798-809.
- Kiyamaz N, Yilmaz N, Mumcu C, Anlar O, Ozen S, Kayaoglu CR (2008). Protective effect of sildenafil (Viagra) in transient spinal cord ischemia. *Pediatr Neurosurg* 44(1): 22-28.
- Koupparis AJ, Jeremy JY, Muzaffar S, Persad R, Shukla N (2005). Sildenafil inhibits the formation of superoxide and the expression of gp47 NAD[P]H oxidase induced by the thromboxane A2 mimetic, U46619, in corpus cavernosal smooth muscle cells. *BJU Int* 96(3): 423-427.
- Kukreja RC, Ockaili R, Salloum F, Yin C, Hawkins J, Das A, et al. (2004). Cardioprotection with phosphodiesterase-5 inhibition--a novel preconditioning strategy. *J Mol Cell Cardiol* 36(2): 165-173.
- Lledo-Garcia E, Subira-Rios D, Rodriguez-Martinez D, Dulin E, Alvarez-Fernandez E, Hernandez-Fernandez C, et al. (2009). Sildenafil as a protecting drug for warm ischemic kidney transplants: experimental results. *J Urol* 182(3): 1222-1225.
- Martinez-Serrano A, Bjorklund A (1996). Protection of the neostriatum against excitotoxic damage by neurotrophin-producing, genetically modified neural stem cells. *J Neurosci* 16(15): 4604-4616.

- Menniti FS, Ren J, Coskran TM, Liu J, Morton D, Sietsma DK, et al. (2009). Phosphodiesterase 5A inhibitors improve functional recovery after stroke in rats: optimized dosing regimen with implications for mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 331(3): 842-850.
- Muzaffar S, Shukla N, Srivastava A, Angelini GD, Jeremy JY (2005). Sildenafil citrate and sildenafil nitrate (NCX 911) are potent inhibitors of superoxide formation and gp91phox expression in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Br J Pharmacol* 146(1): 109-117.
- Pallotti F, Lenaz G (2007). Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines. *Methods Cell Biol* 80: 3-44.
- Paxinos G, Watson C (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Picconi B, Bagetta V, Ghiglieri V, Paille V, Di Filippo M, Pendolino V, et al. (2011). Inhibition of phosphodiesterases rescues striatal long-term depression and reduces levodopa-induced dyskinesia. *Brain* 134(Pt 2): 375-387.
- Puerta E, Barros-Minones L, Hervias I, Gomez-Rodriguez V, Orejana L, Pizarro N, et al. (2012). Long-lasting neuroprotective effect of sildenafil against 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced 5-hydroxytryptamine deficits in the rat brain. *J Neurosci Res* 90(2): 518-528.
- Puerta E, Hervias I, Barros-Minones L, Jordan J, Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, et al. (2010). Sildenafil protects against 3-nitropropionic acid neurotoxicity through the modulation of calpain, CREB, and BDNF. *Neurobiol Dis* 38(2): 237-245.
- Puerta E, Hervias I, Goni-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(3): 755-766.

- Pyriochou A, Zhou Z, Koika V, Petrou C, Cordopatis P, Sessa WC, et al. (2007). The phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil stimulates angiogenesis through a protein kinase G/MAPK pathway. *J Cell Physiol* 211(1): 197-204.
- Raingaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 16(3): 1247-1255.
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22(3): 659-661.
- Saito A, Maier CM, Narasimhan P, Nishi T, Song YS, Yu F, et al. (2005). Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 31(1-3): 105-116.
- Salloum FN, Takenoshita Y, Ockaili RA, Daoud VP, Chou E, Yoshida K, et al. (2007). Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K(ATP) channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 42(2): 453-458.
- Schulz JB, Weller M, Matthews RT, Heneka MT, Groscurth P, Martinou JC, et al. (1998). Extended therapeutic window for caspase inhibition and synergy with MK-801 in the treatment of cerebral histotoxic hypoxia. *Cell Death Differ* 5(10): 847-857.
- Sekine Y, Takeda K, Ichijo H (2006). The ASK1-MAP kinase signaling in ER stress and neurodegenerative diseases. *Curr Mol Med* 6(1): 87-97.
- Silver B, McCarthy S, Lu M, Mitsias P, Russman AN, Katramados A, et al. (2009). Sildenafil treatment of subacute ischemic stroke: a safety study at 25-mg daily for 2 weeks. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 18(5): 381-383.
- Soydan G, Sokmensuer C, Kilinc K, Tuncer M (2009). The effects of sildenafil on the functional and structural changes of ileum induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Eur J Pharmacol* 610(1-3): 87-92.

- Tobiome K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, et al. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2(3): 222-228.
- Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F, Toledo AH (2008). Protein kinases in organ ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 21(4): 215-226.
- Tozzi A, Costa C, Siliquini S, Tantucci M, Picconi B, Kurz A, et al. (2012). Mechanisms underlying altered striatal synaptic plasticity in old A53T-alpha synuclein overexpressing mice. *Neurobiol Aging* 33(8): 1792-1799.
- Vijayvergiya C, Beal MF, Buck J, Manfredi G (2005). Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci* 25(10): 2463-2470.
- 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(9): 1150-1158.
- Whitmarsh AJ, Yang SH, Su MS, Sharrocks AD, Davis RJ (1997). Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol Cell Biol* 17(5): 2360-2371.
- Xia Z, Dickens M, Ringeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270(5240): 1326-1331.
- Yanagisawa D, Kitamura Y, Inden M, Takata K, Taniguchi T, Morikawa S, et al. (2008). DJ-1 protects against neurodegeneration caused by focal cerebral ischemia and reperfusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 28(3): 563-578.
- Zhang L, Zhang RL, Wang Y, Zhang C, Zhang ZG, Meng H, et al. (2005). Functional recovery in aged and young rats after embolic stroke: treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Stroke* 36(4): 847-852.

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(7): 1213-1219.

Zhao S, Zhang L, Lian G, Wang X, Zhang H, Yao X, et al. (2011). Sildenafil attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF-kappaB signaling pathways in N9 microglia. *Int Immunopharmacol* 11(4): 468-474.

Capítulo IV

Chapter 4

Inhibition of calpain-regulated p35/cdk5 plays a central role in sildenafil-induced protection against chemical hypoxia produced by malonate

Lucía Barros-Miñones, Dolores Martín-de-Saavedra, Sergio Perez-Alvarez, Lourdes Orejana, Verónica Suquía, Beatriz Goñi-Allo , Isabel Hervias , Manuela G. López, Joaquin Jordan, Elena Puerta and Norberto Aguirre

BBA Molecular Basis of Disease (en revisión)

Resumen

En los últimos años, numerosos estudios han descrito el efecto protector de los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 en modelos de isquemia en diversos órganos. Sin embargo, los estudios destinados a conocer su efecto en la isquemia cerebral son escasos. Por ello, nos planteamos estudiar el posible efecto neuroprotector del sildenafil frente a la muerte neuronal inducida por la administración intraestriatal de la toxina mitocondrial malonato en ratas. El malonato es un inhibidor de la succinato deshidrogenasa que mimetiza las lesiones de la isquemia cerebral focal. Nuestros resultados demuestran que la administración de sildenafil (1.5 mg/kg p.o.) 30 min antes del malonato (1.5 μ mol/2 μ l), reduce significativamente el volumen de lesión ocasionado por la toxina. Este efecto protector parece relacionado con la inhibición de las vías de señalización activadas por la excitotoxicidad. En concreto, el malonato provoca la activación de la proteasa dependiente de calcio, calpaína y la desregulación de la cinasa dependiente de ciclina 5, cdk5. Como consecuencia, se produce la hiperfosforilación de tau y la degradación del factor de transcripción MEF-2. Todos estos efectos fueron bloqueados por la administración de sildenafil, sugiriendo la implicación de la vía calpaína/p25/cdk5 en sus efectos neuroprotectores. La utilización de inhibidores específicos de estas proteínas confirmó esta implicación. Por otro lado, el sildenafil aumentó la fosforilación de MEF-2 y la relación Bcl-2/Bax y Bcl-xL/Bax; efectos que podrían contribuir en la prevención de la muerte neuronal. Por último, comprobamos este efecto neuroprotector del sildenafil en rodajas de hipocampo sometidas a privación de oxígeno y glucosa cuando se añade en el tiempo de reoxigenación, así como en el modelo in vivo del malonato cuando es administrado después de la toxina. Así, establecemos la ventana terapéutica del sildenafil en este modelo de hipoxia química en 3 h después de la lesión.

Abstract

Phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitors have recently been reported to exert beneficial effects against ischemia-reperfusion injury in several organs but their neuroprotective effects in brain stroke models are scarce. The present study was undertaken to assess the effects of sildenafil against cell death caused by intrastriatal injection of malonate, an inhibitor of succinate dehydrogenase; which produces both energy depletion and lesions similar to those seen in cerebral ischemia. Our data demonstrate that sildenafil (1.5 mg/kg p.o.), given 30 min before malonate (1.5 μ mol/2 μ l), significantly decreased the lesion volume caused by this toxin. This protective effect can be probably related to the inhibition of excitotoxic pathways. Thus, malonate induced the activation of the calcium-dependent protease, calpain and the cyclin-dependent kinase 5, cdk5; which resulted in the hyperphosphorylation of tau and the cleavage of the protective transcription factor, myocyte enhancer factor 2, MEF2. All these effects were also significantly reduced by sildenafil pre-treatment, suggesting that sildenafil protects against malonate-induced cell death through the regulation of the calpain/p25/cdk5 signaling pathway. Similar findings were obtained using specific inhibitors of calpain or cdk5, further supporting our contention. Sildenafil also increased MEF2 phosphorylation and Bcl-2/Bax and Bcl-xL/Bax ratios, effects that might as well contribute to prevent cell death. Finally, sildenafil neuroprotection was extended not only to rat hippocampal slices subjected to oxygen and glucose deprivation when added at the time of reoxygenation, but also, in vivo when administered after malonate injection. Thus, the therapeutic window for sildenafil against malonate-induced hypoxia was set at 3 h.

Keywords:

Apoptosis, Calpain; Cyclin-dependent kinase 5 (cdk5); Excitotoxicity; Malonate; Sildenafil.

1. Introduction

Phosphodiesterase 5 (PDE5) is a selective enzyme that catalyzes the breakdown of the cyclic guanosine monophosphate, cGMP [1] and has been found in several tissues and some brain regions [2, 3]. Neuroprotective effects of PDE5 inhibitors (PDE5i), such as sildenafil, have been described in several models of neurological disorders. Lately, and encouraged by the results obtained in several organs [4, 5], new studies are focusing on the potential role of sildenafil, and other PDE5i, in the treatment of cerebral ischemia. Indeed, recent reports have shown that delayed treatment with PDE5 inhibitors increases neurogenesis, angiogenesis, and synaptogenesis, and improves functional outcome after stroke in young and aged rats [3, 6-11]. Based on these findings, safety studies in ischemic stroke patients are being conducted prior to investigating the neurorestorative properties of sildenafil in humans [12].

Despite all these evidences, there are few studies regarding the mechanism underlying the beneficial effects exerted by sildenafil in brain ischemic stroke models. The present study was, therefore, undertaken to assess the plausible neuroprotective effects of sildenafil against chemical hypoxia caused by malonate, a reversible inhibitor of succinate dehydrogenase (SDH). Intrastratial administration of this mitochondrial toxin produces both energy depletion and lesions that share many features with those that accompany focal ischemia [13]. The mechanisms of malonate-induced neuronal cell death comprise the generation of reactive oxygen species, secondary excitotoxicity and apoptosis [14, 15].

Excitotoxicity has been associated with neuronal death in brain ischemia through the deregulation of specific cell signaling pathways [16, 17]. Among them, aberrant activation of the cyclin-dependent kinase 5, cdk5, is directly associated with neuronal death following stroke [18, 19]. A main step in cdk5 deregulation is the cleavage of its activator protein p35 by calpains, a group of calcium-activated cytosolic proteases [20-23]. Since calpain and cdk5 have been proposed as potential targets for the treatment of stroke [18, 24, 25], we focused our study on this intracellular signaling pathway as a plausible target for the neuroprotective effects of sildenafil against malonate-induced chemical

hypoxia. Finally, we also used an in vitro brain ischemia-reperfusion model, namely rat hippocampal slices subjected to oxygen and glucose deprivation (OGD) followed by reoxygenation to assess whether this PDE5i would result therapeutic when administrated after the insult. Positive findings led us to establish its therapeutic window against malonate-induced cell death; which was set at 3 h post insult.

2. Material and methods

2.1. Drugs and Chemicals

Sodium malonate dibasic monohydrate was from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain); Carbobenzoxy-valinyl-phenylalaninal, MDL 28170, Calpain inhibitor III and 2-(R)-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurine, Roscovitine, cdk5 inhibitor were from Calbiochem (Darmstadt, Germany); 1-[4-ethoxy-3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo [4,3-d]pyrimidin-5yl) phenylsulfonyl]-4-methylpiperazine citrate (Sildenafil citrate, Viagra™) was from Pfizer.

2.2. *In vivo* studies

2.2.1. *Animals, treatments, and experimental design*

Experiments were carried out in male Wistar rats (220–270 g; Harlan Iberica, Barcelona, Spain). Rats (four per cage) were housed in constant conditions of humidity and temperature (22 ± 1 °C) with a 12-h/12-h light-dark cycle (lights on at 7:00 h). Food and water were available ad libitum. The experiments were performed after approval of the protocol by the institutional Ethics Committee, in accordance with the law in force (European Directive 86/609/EEC and Real Decreto 1201/2005), following the Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

Rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg i.p.) and placed in a Kopf stereotaxic frame, with the incisor bar set at 3.3 mm below the interaural line. The skull was exposed, bregma pointed, and two holes were drilled at coordinates according to

the atlas of Paxinos and Watson [26]: +0.6 mm AP, \pm 3 mm ML. Animals were injected with 2 μ l of malonate, MDL 28170 or roscovitine using a 10- μ l Hamilton syringe with a 26-gauge needle lowered 5.5 mm from the skull. After injection, the needle was left in place for 2 min to allow complete diffusion of the injected volume.

In a first set of experiments, malonate (1.5 μ mol in 2 μ L, pH 7.4-7.6) or PBS were infused into the striatum and animals were sacrificed at different time points (10 min, 30 min, 1, 3, 6 or 9 h) for western blot analysis. In an attempt to elucidate the mechanisms underlying sildenafil neuroprotection, rats were also administered orally with saline or sildenafil (1.5 mg/kg) 30 min before malonate or PBS injection and sacrificed 6 h or 72 h after treatment for western-blot and histochemistry analysis.

In a different set of experiments, the calpain inhibitor, MDL28170 (1 nmol in 2 μ L, pH 7.4-7.6 in DMSO 50%) or the cdk5 inhibitor, roscovitine (40 nmol in 2 μ L, pH 7.4-7.6 in DMSO 50%), alone or in combination with malonate (1.5 μ mol DMSO 50%), were also injected into the striatum and animals were killed 6 h or 72 h after treatment. Note that sham group received 2 μ L of DMSO 50%.

Finally, rats were orally administered with saline or sildenafil (1.5 mg/kg) and were sacrificed at different time points (3, 6, 12 or 24 h) to analyze the levels of Bcl-2, Bcl-xL and Bax in the striatum.

In order to establish the therapeutic window of sildenafil, we also infused malonate (1.5 μ mol in 2 μ L) or PBS into the striatum while saline or sildenafil (1.5 mg/kg) were administered intraperitoneally at different time points (-30 mins, -10 mins, +1h, +3h, +6h). Animals were sacrificed 72 h after treatment for histochemistry analysis.

In all cases, the solution of sildenafil was prepared as previously described [27] by grinding Viagra™ tablets into powder and dissolved in distilled water. The drug solution was filtered (0.45 μ m pore size) before oral administration. Dose was chosen to simulate the dose for a patient with 70 kg body weight after orally taking a 20 mg tablet of Viagra™ according to Reagan-Shaw, Nihal and Ahmad [28].

2.2.2. Cytochrome oxidase histochemistry and analysis of lesion size

Seventy-two h after treatments, rats were killed and brains were frozen immediately on dry ice and then sectioned (25 μ m) on a cryostat. Every second section throughout the extent of the lesion was mounted on a polylysine-coated slide. Incubation medium consisted of 5 mg cytochrome c and 30 mg 3,3'-diaminobenzidine in 50 ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Slides were incubated for 90 min at 37°C and then removed to 4% neutral, buffered paraformaldehyde for 10 min. Sections were rinsed with distilled water, dehydrated, cleared in xylene, and coverslipped [29]. The lesioned area on each section was quantified using a video-based MCID image analysis system (Imaging Research, St. Catharines, Ontario, Canada). Area measurements were summed and multiplied by intersectional distance (50 μ m) to determine lesion volume.

2.2.3. Subcellular fractionation and Western blot analysis

For western blot analysis, animals were killed by decapitation; brains were rapidly removed, placed on ice and 2 mm thick tissue section was taken (approximately 1 mm to either side of the injection zone). Striatal tissue was dissected out and fractionated into cytosolic and nuclear fractions according to established protocols [30-32], with some modifications. Briefly, tissue were gently homogenized by 20 strokes in a glass-Teflon Potter homogenizer on ice in 200 μ L of buffer A (10 mM Tris, pH 7.4, 320 mM sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, and 1 mg/ml fatty-acid-free bovine serum albumin, BSA) containing phosphatase inhibitors (Phosphatase Inhibitor Cocktail I, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and protease inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail Set I, Animal-Free Aprotinin, Calbiochem, Darmstadt, Germany).

Homogenates were then centrifuged at 1500g for 5 min at 4 °C. Pellets were resuspended in 80 μ L of Buffer B (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8.5, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% Nonidet, 1 mM DTT, containing phosphatase and protease inhibitors) and were centrifuged twice at 1500g for 5 min at 4 °C to obtain the nuclear fraction. Supernatants were centrifuged at 15,000 g for 20 min at 4 °C. Resulting pellets were designated mitochondrial fractions, whereas supernatants were further centrifuged (100,000 g for 1 h at 4 °C) and saved as cytosolic (S100) fractions. The mitochondrial fraction was further resuspended in

40 μ L of buffer A without BSA and centrifuged twice at 10.000 g for 20 min at 4 °C to obtain the enriched mitochondrial fraction. To verify the relative subcellular purification, each fraction was subjected to Western blotting for thioredoxin 1 (2298; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) as a cytosolic marker, cytochrome c oxidase, COX (MitoSciences, Eugene, OR) as a mitochondrial marker and Lamin A/C (2032 Cell Signaling Technology, Beverly, MA) as a nuclear marker.

For MEF2 and p-MEF2 determinations at 72 h and for Bcl-2, Bcl-xL and Bax, tissues were homogenized as previously described [33] to obtain whole cell extracts. Finally, protein was determined by Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Proteins (20 μ g) were separated by electrophoresis on a sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel under reducing conditions. Membranes were probed using anti pMEF2 (Ser59)-R, anti-MEF2 (N-18) (13919 and 13917, respectively; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anti-pTau AT8 (MN1020 Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, USA); anti-Bax, anti-BCL, anti-cdk5, anti-Lamin A/C; anti-P35/P25, anti-Tau (clone Tau46) (2772, 2876, 2506, 2032, 2680, 4029, respectively; Cell Signaling Technology, Beverly, MA), 1/1000 dilution or anti- β -actin monoclonal antibody (A1978; Sigma, Madrid, Spain) anti-COX subunit IV (MS404, MitoSciences, Eugene, OR), and anti- α -fodrin (MAB1622, Chemicon, Millipore, Billerica, MA, USA), 1/10000 dilution. Blots were visualized using a chemiluminescence ECL Western blotting detection reagent (Amersham, Buckinghamshire, England). Band intensity was estimated densitometrically on a GS-800 calibrated densitometer (Biorad One).

2.3. *In vitro* studies

2.3.1. Hippocampal slices preparation

We used the protocol described by Egea and co-workers [34] with slight modifications. Male Sprague-Dawley rats (275-325 g) were quickly decapitated under sodium pentobarbital anesthesia (60 mg/kg, i.p.), forebrains were rapidly removed from the skull and placed into ice-cold Krebs bicarbonate dissection buffer (pH 7.4), containing (in mM): NaCl 120, KCl 2, CaCl₂ 0.5, NaHCO₃ 26, MgSO₄ 10, KH₂PO₄ 1.18, glucose 11 and

sucrose 200. The chamber solutions were pre-bubbled with either 95% O₂/5% CO₂ or 95% N₂/5% CO₂ gas mixtures for at least 45 min before slice immersion, to ensure O₂ saturation or removal respectively. The hippocampi were quickly dissected and sectioned in transverse slices of 350 (MTT assay) or 200 µm thick (Fluorescence and LDH assays) using a chopper (Mc Ilwain Tissue Chopper, The Micle Laboratory Engineering Company). After an initial stabilization period of 1 h, the slices corresponding to the control group were incubated 15 min in a Krebs solution with the following composition (in mM): NaCl 120, KCl 2, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 26, MgSO₄ 1.19, KH₂PO₄ 1.18 and glucose 11; this solution was equilibrated with 95% O₂/5% CO₂. Oxygen and glucose deprivation was induced by incubating the slices for 15 min period in a glucose-free Krebs solution, equilibrated with a 95% N₂/5% CO₂ gas mixture; glucose was replaced by 2-deoxyglucose. After this OGD period, slices were returned back to an oxygenated normal Krebs solution containing glucose (reoxygenation period) for 2 h in the absence or presence of sildenafil (10 µM). In all experiments sildenafil was only present during the 2 h reoxygenation period (see protocol in Fig. 8A). Experiments were performed at 37 °C. A control and an OGD/reoxygenation group were included in all experiments.

2.3.2. Quantification of cell death

Hippocampal cell viability was determined through the ability of the cells to reduce MTT [35] and also by measuring the activity of lactate dehydrogenase (LDH) released into the incubation media [36], using a commercial kit (Cytotoxicity Detection Kit, Roche) and following the manufacturer's indications.

2.3.3. Quantification of cell death in propidium iodide (PI) stained hippocampal slices

At the end of the experiment, the hippocampal slices were loaded with 5 µg/ml PI during the last 5 min of incubation. Mean PI in CA1, CA3 and dentate gyrus (DG) regions in each slice, after a given treatment, were analyzed.

2.3.4. Measurement of ROS production in hippocampal slices

To measure cellular reactive oxygen species (ROS), we used the molecular probe H₂DCFDA [37]. Immediately after chopper sectioning, 200 µm thick hippocampal slices

were loaded with 80 μ M H₂DCFDA for 45 min in Krebs solution. Subsequently, the slices were washed twice with Krebs solution and OGD/Reox protocol started.

Fluorescence was measured in a fluorescence inverted NIKON eclipse T2000-U microscope. Wavelengths of excitation and emission for PI were 530 and 580 respectively and 485 and 520 nm for dichlorofluorescein. Images were taken at CA1, CA3 and DG at magnifications of 100 \times . Fluorescence analysis was performed using the Metamorph programme version 7.0. Fluorescence in basal conditions was taken as 1 and experimental variables were normalized with respect to this value.

2.4. Data Analysis

Results were expressed as mean \pm S.E.M. Comparisons among groups were made using Student's t-test or one-way analysis of variance followed by Tukey test for multiple group comparisons. 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 protects against malonate-induced neurotoxicity and inhibits calpain activation

Rats were administered with sildenafil (1.5 mg/kg p.o.) 30 min before striatal stereotaxic injection of malonate (1.5 μ mol) to investigate its neuroprotective effects against neuronal death caused by this mitochondrial toxin. Rats were killed 72 h later and tissue was prepared for histochemistry. As shown in Fig. 1A, malonate produced a large striatal lesion that was significantly reduced in those animals receiving sildenafil.

It has been suggested that excitotoxicity plays a key role in the mechanisms underlying malonate neurotoxicity [15, 29]. We therefore studied the time course activation of calpain, one the major effector of calcium deregulation [17, 38, 39]. For this, we examined the breakdown products of α -fodrin, a sensitive substrate for calpain, at different time points after malonate. As shown in Figure 1B, α -fodrin breakdown products

accumulated in a time-dependent manner. In particular, calpain specific 145/150 kDa α -fodrin fragments began to accumulate by 30 minutes after malonate, reaching its maximum between 6 to 9 h later. In parallel, the intensity of the full-length protein (280 kDa) was reduced. Based on these results, we next investigated whether sildenafil affected the activation of this protease. In this case, rats were killed 6 hours after malonate, as we had observed a sustained increase of calpain at this time point. Noteworthy, sildenafil significantly reduced calpain activation (Fig. 1C).

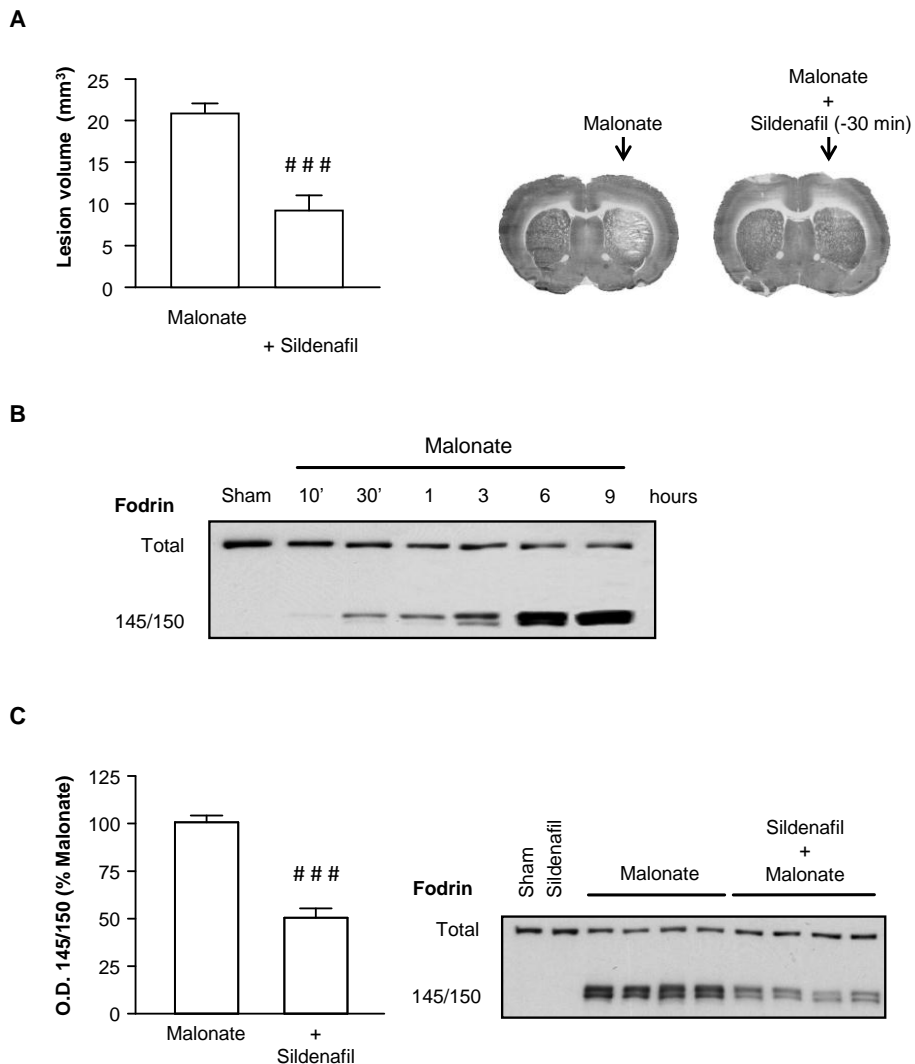


Figure 1. Sildenafil protects against malonate-induced neurotoxicity and inhibits calpain activation. Panel A. Sildenafil (1.5 mg/kg p.o.) was administered 30 min before intrastriatal administration of malonate (1.5 μ mol/2 μ l). Rats were killed 72 h later. Representative cytochrome oxidase-stained slices and quantification of

malonate-induced striatal lesions (mm^3) show that the neurotoxic effect of malonate is attenuated by sildenafil. Data are mean \pm S.E.M (n=9 animals per group). [t (16)=6.452, P<0.001]. **Panel B.** Animals were sacrificed at different time points after intrastriatal injection of malonate (1.5 μmol / 2 μl). Representative Western blots of the time course activation of calpain induced by malonate. Activation of calpain is demonstrated by increased levels of specific calpain-cleaved α -fodrin fragments (145/150 kDa). (n= 5 per group). **Panel C.** Quantitative measurement of protein levels and representative western blots showing the effect of sildenafil on malonate induced calpain activation. Sildenafil (1.5 mg/kg p.o.) was administered 30 min before intrastriatal administration of malonate (1.5 μmol /2 μl) and animals were sacrificed 6 h after treatments. β -actin was used as equal loading control. Note that values of cleaved α -fodrin (145/150 kDa) from sham and sildenafil groups were so weak that were not taken into account for statistical analysis. Data are mean \pm S.E.M (n=5 animals per group). [t(8)=6.202;P< 0.001]. ####P<0.001 vs. malonate.

3.2. Sildenafil inhibits malonate-induced cdk5 activation and its translocation to the nucleus

Under pathological conditions, calpain cleaves p35 to its more stable isoform, p25. Cleavage of p35 to p25 and formation of the p25/cdk5 complex is associated with the pathologic activity of cdk5 and the alteration of its subcellular distribution [22, 40]. As shown in figure 2A, western blot analysis revealed a significant increase in the p25/p35 ratio in the striatum of animals treated with malonate, an effect that was significantly reduced by sildenafil. Next, we measured cdk5 levels in cytoplasmic and nuclear fractions and found that sildenafil reversed the translocation of cdk5 to the nucleus induced by malonate (Fig. 2B). Both measurements were carried out 6 h after malonate administrations.

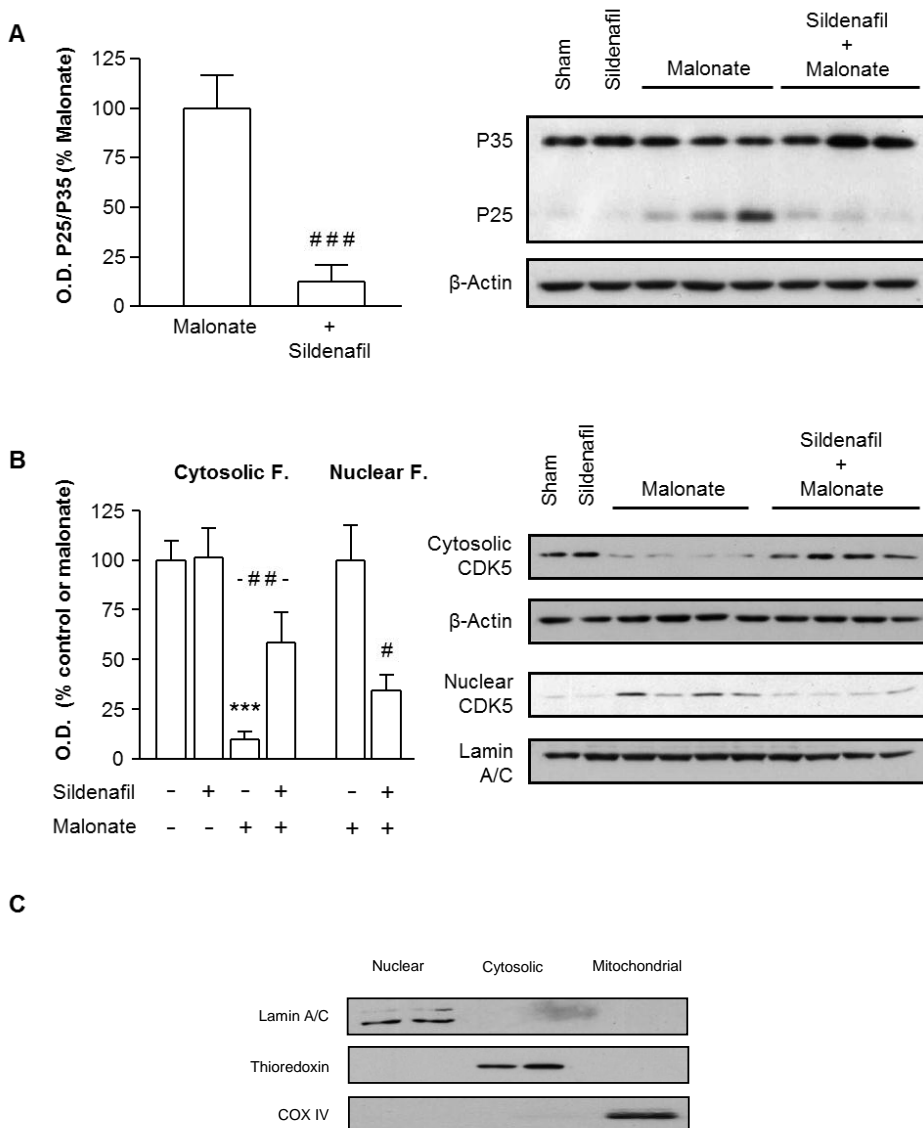


Figure 2. Sildenafil inhibits malonate-induced p25/cdk5 pathway activation. Sildenafil (1.5 mg/kg p.o.) was administered 30 min before intraatrial administration of malonate (1.5 μ mol/2 μ l). Rats were sacrificed 6 h after treatments. **Panel A.** Quantitative measurements and representative blots showing that sildenafil reverses malonate-induced cleavage of p35 to p25. β -actin was used as equal loading control. Note that p25 values from sham and sildenafil groups were so weak that were not taken into account for statistical analysis. Data are mean \pm S.E.M (n=5 animals per group). [t(8)=3.997;P< 0.001]. **Panel B.** Quantitative measurement and representative blots of cdk5 levels in both cytosolic and nuclear fractions showing that sildenafil reverses malonate-induced cdk5 translocation. Note that nuclear values from sham and sildenafil groups were so weak that were not taken into account for statistical analysis. β -actin and lamin A/C were used as equal loading control. (n= 5-8 per group). Statistical analysis yielded the following results: for cytosolic cdk5 [F(3,17)=22.08;P< 0.001] and for nuclear cdk5 [t(10)=2.703,P<0.05]. **Panel C.** Representative blots showing the purity of our samples. ***P<0.001 vs. sham; #P< 0.05, ###P< 0.01, ####P<0.001 vs. malonate

3.3. Calpain inhibition protects against malonate-induced cell death

To evaluate whether calpain inhibition participates in the mechanisms underlying sildenafil protection, in parallel experiments, we investigated whether the inhibition of this protease would result in the corresponding decrease of malonate neurotoxicity. For this, rats were treated with the specific calpain inhibitor, MDL28170 [41], in combination with malonate. As seen in figure 3A, the co-administration of MDL28170 (1 nmol/2 μ L) resulted in a significant decrease of α -fodrin breakdown products, indicating an effective blockage of calpain activity. This effect was accompanied by a decrease of p35 cleavage and the inhibition of cdk5 translocation to the nucleus. Moreover, calpain inhibition decreased neuronal death caused by malonate administration, assessed by cytochrome oxidase histochemistry (Fig. 3B).

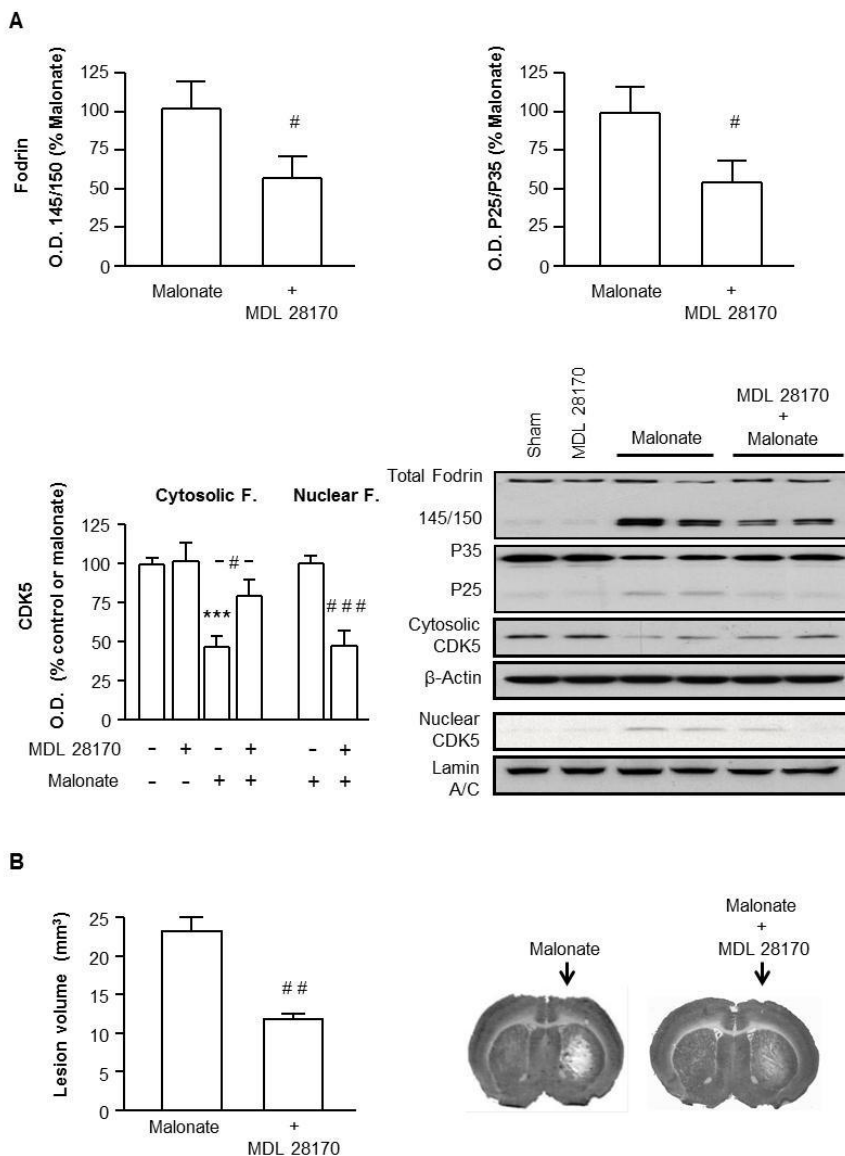


Figure 3. Calpain inhibition protects from malonate induced neurotoxicity. MDL28170 (1 nmol/2 μ l) was administered intrastriatally in combination with malonate (1.5 μ mol/2 μ l). **Panel A.** Quantitative measurements and representative blots showing that MDL28170 inhibits not only calpain activation, but also the cleavage of p35 to p25 and the translocation of cdk5 to the nucleus. For this, rats were killed 6 h after treatment. β -actin and lamin A/C were used as equal loading control. Note that some values from sham and sildenafil groups were so weak that were not taken into account for statistical analysis. Data are mean \pm S.E.M. (n=5-9 animals per group). Statistical analysis yielded the following results: for fodrin breakdown products [t(8)=2.771;P< 0.05]; for p25/p35 [t(10)=2.452;P< 0.05]; for cytosolic cdk5 [F(3,19)=10.95;P<0.001] and for nuclear cdk5 [t(11)=5.123;P<0.001] **Panel B.** Representative cytochrome oxidase-stained slices and quantification of malonate-induced striatal lesions (mm³) show that MDL28170 inhibits the neurotoxic effect of malonate observed 72 h after treatment. Data are mean \pm S.E.M. (n=7) [t(12)=5.346,P<0.001]. Different from the corresponding sham group: ***P<0.001. Different from malonate-only animals: #P<0.05; ##P<0.01; ###P<0.001.

3.4. Cdk5 inhibition protects against malonate-induced cell death

In order to evaluate the involvement of cdk5 in the neurotoxic mechanisms triggered by malonate, we used roscovitine, a specific inhibitor of this kinase [42], in combination with malonate. Treatment with roscovitine (40 nmol/2 μ L) not only inhibited the activation of cdk5 and its translocation to the nucleus but also blocked the activation of calpain (Fig. 4A). Moreover, the significance of p25/cdk5 in malonate-induced neuronal death was also confirmed since roscovitine significantly decreased the histological lesion found after malonate administration (Fig. 4B). These results not only support the key role of the aberrant activation of cdk5 in malonate neurotoxicity but also point to its inhibition by sildenafil as a plausible mechanism underlying its cytoprotective effects.

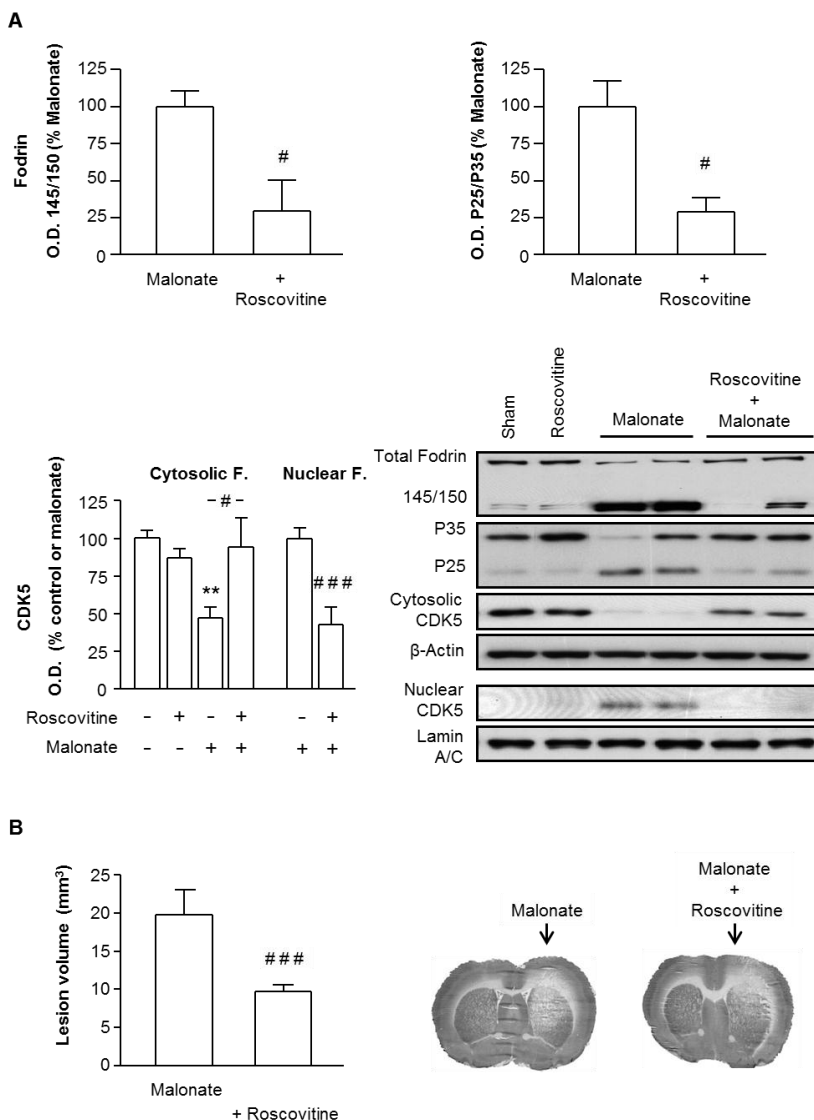


Figure 4. Cdk5 inhibition protects against malonate-induced cell death. Rats were administered intrastrially with malonate (1.5 $\mu\text{mol}/2 \mu\text{l}$) alone or in combination with the cdk5 inhibitor, roscovitine (40 nmol/2 μl). **Panel A.** Quantitative measurement of protein levels and representative western blots showing that roscovitine inhibits not only the translocation of cdk5 from the cytosol to the nucleus, but also calpain activation and the subsequent cleavage of p35. Note that some values from sham and sildenafil groups were so weak that were not taken into account for statistical analysis. β -actin and lamin A/C were used as equal loading control. Data are mean \pm S.E.M (n=5-9 animals per group). Statistical analysis yielded the following results: for fodrin breakdown products [t(9)=3.200;P< 0.05]; for p25/p35 [t(12)=2.851;P< 0.05]; for cytosolic cdk5 [F(3,22)=5.468;P<0.01] and for nuclear cdk5 [t(11)=4.532;P<0.001] **Panel B.** Representative cytochrome oxidase-stained slices and quantification of malonate-induced striatal lesions (mm³). Roscovitine was administered 30 min before malonate and animals were sacrificed 72 h after malonate injection. Data are mean \pm S.E.M. (n=5-6). [t(9)=3.301,P<0.01]. Different from the corresponding sham group: **P<0.01. Different from malonate-only animals: #P<0.05; ###P<0.01; ####P<0.001.

3.5. Sildenafil prevents tau hyperphosphorylation caused by malonate

Since p25-activated cdk5 has been suggested to participate in the hyperphosphorylation of tau [20], we analysed the phosphorylation status of this microtubule associated protein in malonate-injured rats and in animals pre-treated with sildenafil. We used the phospho-tau antibody, AT8, which recognizes aberrantly phosphorylated epitopes on Ser202/Thr205 and which is considered to be the most appropriated antibody to measure cdk5-induced tau phosphorylation [43]. As shown in Fig. 5A, western blot analysis revealed that phosphorylated tau levels normalized to total tau (detected by T46 antibody) were significantly increased 6 h after malonate injection; effect that was significantly reduced by sildenafil.

As we have previously confirmed that activation of calpain and cdk5 are required for malonate-induced neurotoxicity, we also analysed the implication of both proteins on malonate-induced tauopathy. Figures 5B and 5C demonstrate that administration of either MDL28170 or roscovitine in combination with malonate significantly attenuated tau hyperphosphorylation.

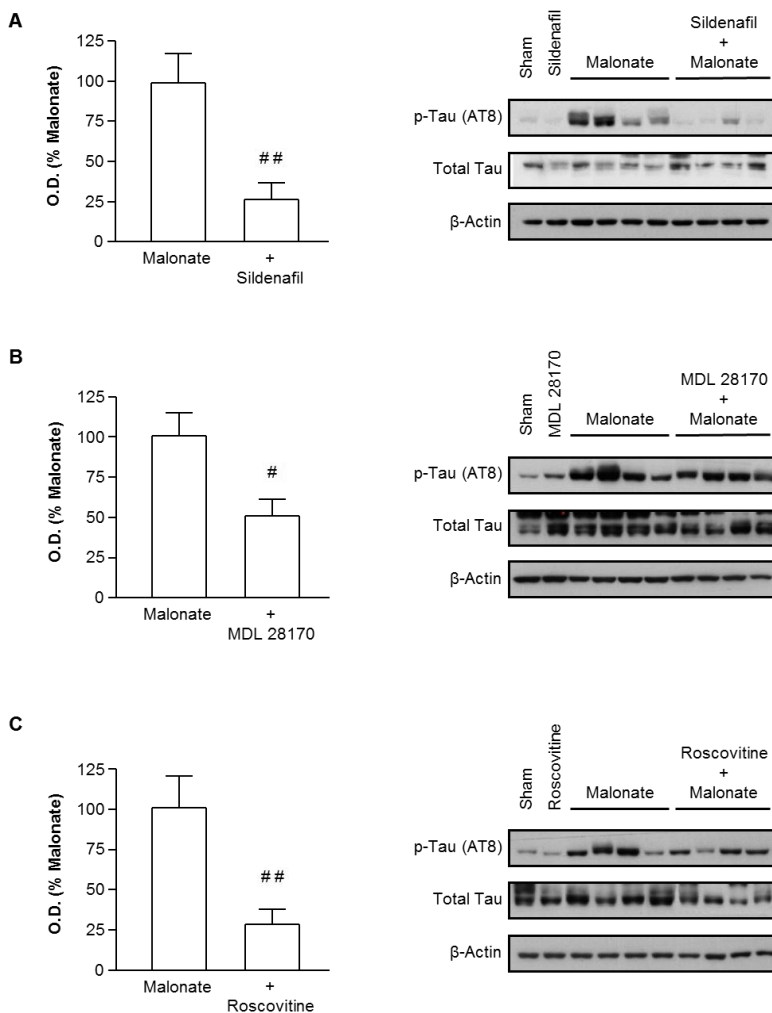


Figure 5. Sildenafil prevents tau hyperphosphorylation caused by malonate. Panel A. Sildenafil (1.5 mg/kg p.o.) was administered 30 min before malonate injection (1.5 $\mu\text{mol}/2 \mu\text{l}$) and rats were killed 6 h later. Quantitative measurement of protein levels and representative western blots showing that sildenafil produces a significant decrease in tau phosphorylation caused by malonate. β -actin was used as equal loading control. Note that values from sham and sildenafil groups were so weak that were not taken into account for statistical analysis. Data are mean \pm S.E.M. (n=6-7). [t(11)=3.560,P<0.01]. **Panel B.** MDL28170 (1 nmol/2 μl) was administered intrastrially in combination with malonate (1.5 $\mu\text{mol}/2 \mu\text{l}$) and rats were killed 6 h later. Quantitative measurement of protein levels and representative western blots showing that MDL28170 produces a significant decrease in tau phosphorylation caused by malonate. β -actin was used as equal loading control. Note that values from sham and MDL28170 groups were so weak that were not taken into account for statistical analysis. Data are mean \pm S.E.M. (n=5-9). [t(12)=2.428,P<0.05]. **Panel C.** Roscovitine (40 nmol/2 μl) was administered intrastrially in combination with malonate (1.5 $\mu\text{mol}/2 \mu\text{l}$) and rats were killed 6 h later. Quantitative measurement of protein levels and representative western blots showing that roscovitine produces a significant decrease in tau phosphorylation caused by malonate. β -actin was used as equal loading control. Note that values from sham and roscovitine groups were so weak that were not taken into account for statistical analysis. Data are mean \pm S.E.M. (n=5-6) [t(9)=3.463,P<0.01]. #P< 0.05, ##P< 0.01 vs. malonate

3.6. Sildenafil inhibits MEF2 cleavage induced by malonate

The phosphorylation at serine 59 of the transcription factor myocyte enhancer factor 2 (MEF2) increases its survival promoting activity [44]. By contrast, the translocation of cdk5 to the nucleus leads to its degradation, an effect associated to neuronal death in stroke models [45]. Based on our previous results we analysed total and p-MEF2 (ser59) levels 6 h after malonate. Although we had previously shown that cdk5 translocates to the nucleus by this time, we did not find any effect of malonate on total or p-MEF2 levels. Of notice, sildenafil significantly enhanced the phosphorylation of MEF2 at ser 59 (Fig 6A). To further investigate the integrity of MEF2, we next decided to prepare whole cell lysates from animals treated with malonate 72 h before. As shown in figure 6B, levels of both, phosphorylated and total protein, decreased in the malonate-injured group, an effect significantly reversed by sildenafil. A plausible explanation for such findings could be attributed to the inhibition of cdk5 activation and its translocation to the nucleus since roscovitine produced similar results (Fig 6C).

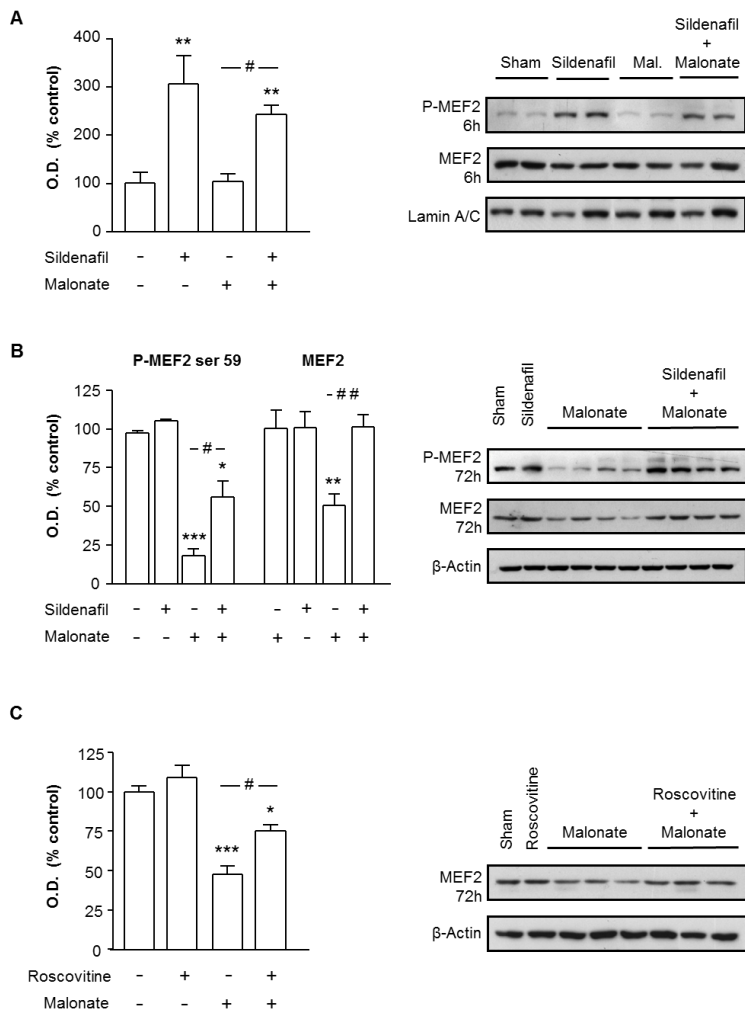


Figure 6. Sildenafil inhibits MEF2 cleavage induced by malonate. **Panel A.** Sildenafil (1.5 mg/kg p.o.) was administered 30 min before malonate injection (1.5 μ mol/2 μ l) and animals were sacrificed 6 h after treatment. Quantitative measurement of protein levels and representative western blots showing that sildenafil increases MEF-2 phosphorylation at ser-59. β -actin was used as equal loading control. Data are mean \pm S.E.M (7-9) [F(3,23)=8.444;P< 0.001]. **Panel B.** Sildenafil (1.5 mg/kg p.o.) was administered 30 min before malonate injection (1.5 μ mol/2 μ l) and animals were sacrificed 72 h after treatment. Whole cell extracts were prepared for western-blot analysis. Quantitative measurement of protein levels and representative western blots showing that sildenafil inhibits malonate-inducing degradation of phosphorylated and total MEF-2. β -actin was used as equal loading control. Data are mean \pm S.E.M (n=5). Statistical analysis yielded the following results: for p-MEF-2 [F(3,11)=22.80;P< 0.001].; for total MEF-2 [F(3,30)=5.629;P< 0.01]. **Panel C.** Roscovitine (40 nmol/2 μ l) was administered intrastriatally in combination with malonate (1.5 μ mol/2 μ l) and rats were killed 72 h later. Whole cell extracts were prepared for western-blot analysis. Quantitative measurement of protein levels and representative western blots showing that roscovitine inhibits malonate-inducing degradation of MEF-2. β -actin was used as equal loading control. Data are mean \pm S.E.M (5) [F(3,11)=25.97;P< 0.001]. Different from the corresponding sham group: *P<0.05; **P<0.01;***P<0.001. Different from malonate-only animals: #P<0.05; ##P<0.01.

3.7. Sildenafil increases the expression of Bcl-2 and Bcl-xL

Some authors have previously demonstrated that malonate causes the activation of apoptotic pathways [46-48]. For this reason, we next studied the subcellular location of two proteins implicated in apoptosis, namely Bax and cytochrome c (cyt c), 10 min, 30 min, 1, 3, 6 or 9 h after malonate injection. Bax, which normally resides in the cytosol, promotes apoptosis by translocating to the mitochondria which leads to the subsequent release of cyt c [49-51]. In contrast to those previous studies, we did not find any change on the subcellular location of either protein at any time point. Figure 7A shows the results obtained 6 h after malonate injection.

In parallel, we evaluated the effect of sildenafil on two anti-apoptotic proteins, Bcl-2 and Bcl-xL. For this, a single dose of sildenafil (1.5 mg/kg, p.o.) was administered and rats were sacrificed at different time points (0, 3, 6, 12 and 24 h after treatment). As shown in figure 7B, sildenafil enhanced the levels of Bcl-2 and Bcl-xL whereas no changes in Bax expression were observed. The Bcl-2/Bax ratio reached its maximum level at 24 h while the Bcl-xL/Bax ratio was increased only at 6 and 12 h after sildenafil.

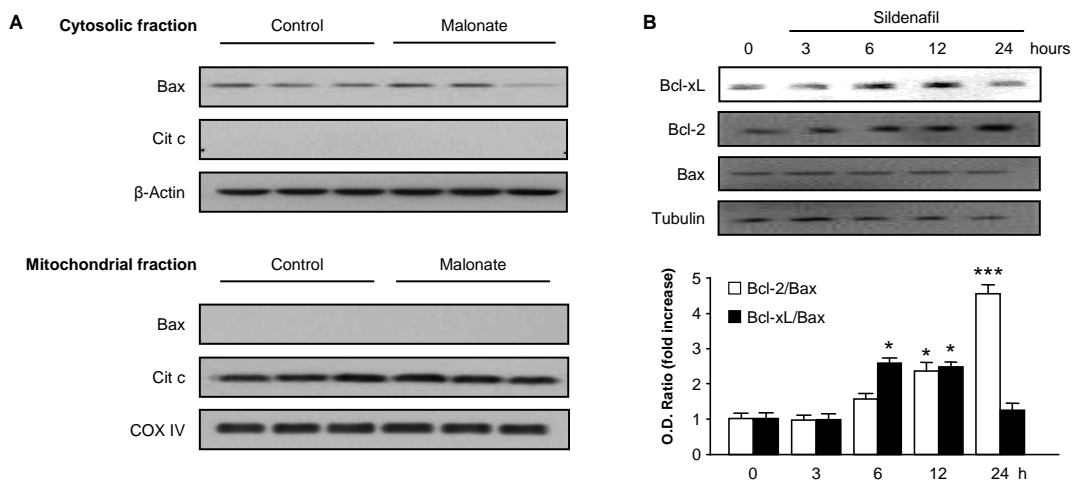


Figure 7. Sildenafil increases the expression of Bcl-2 and Bcl-xL. Panel A. Rats were administered intrastrially with malonate (1.5 μ mol/2 μ l) and sacrificed at different time points. Representative Western blots showing no changes on Bax or cyt c subcellular location 6 h after malonate injection. Panel B. Rats were sacrificed at different time points after a single dose of sildenafil (1.5 mg/kg p.o.). Quantitative measurements and representative blots showing that sildenafil increases expression of Bcl-2 and Bcl-xL. No effect on Bax expression was observed. β -actin was used as equal loading control.

3.8. Sildenafil reduces cell death of hippocampal slices subjected to OGD/reoxygenation

Sildenafil added to the incubation medium post-OGD (see protocol in figure 8A) afforded a significant cell protection revealed by a partial recovery of MTT metabolism reduction found in hippocampal slices subjected to OGD/reox (Fig. 8B). These results were in accordance with LDH measurements. While OGD/reox protocol almost doubled the amount of LDH released to the incubation medium, sildenafil decreased this amount by 50% (Fig 8C). Finally, when cell viability was measured by PI fluorescence (Fig 8D), there was an approximately two-fold increase in the CA1, CA3 and the dentate gyrus (DG) due to OGD/reox that was reduced by sildenafil in the CA1 and in the DG but not in the CA3 region of the hippocampus. As expected, ROS production was increased in the OGD/reox group at the end of the 2 h reoxygenation period. Although there was a trend towards reduction in ROS production, sildenafil addition did not produce any beneficial effect in any of the hippocampal areas studied (Fig. 8E).

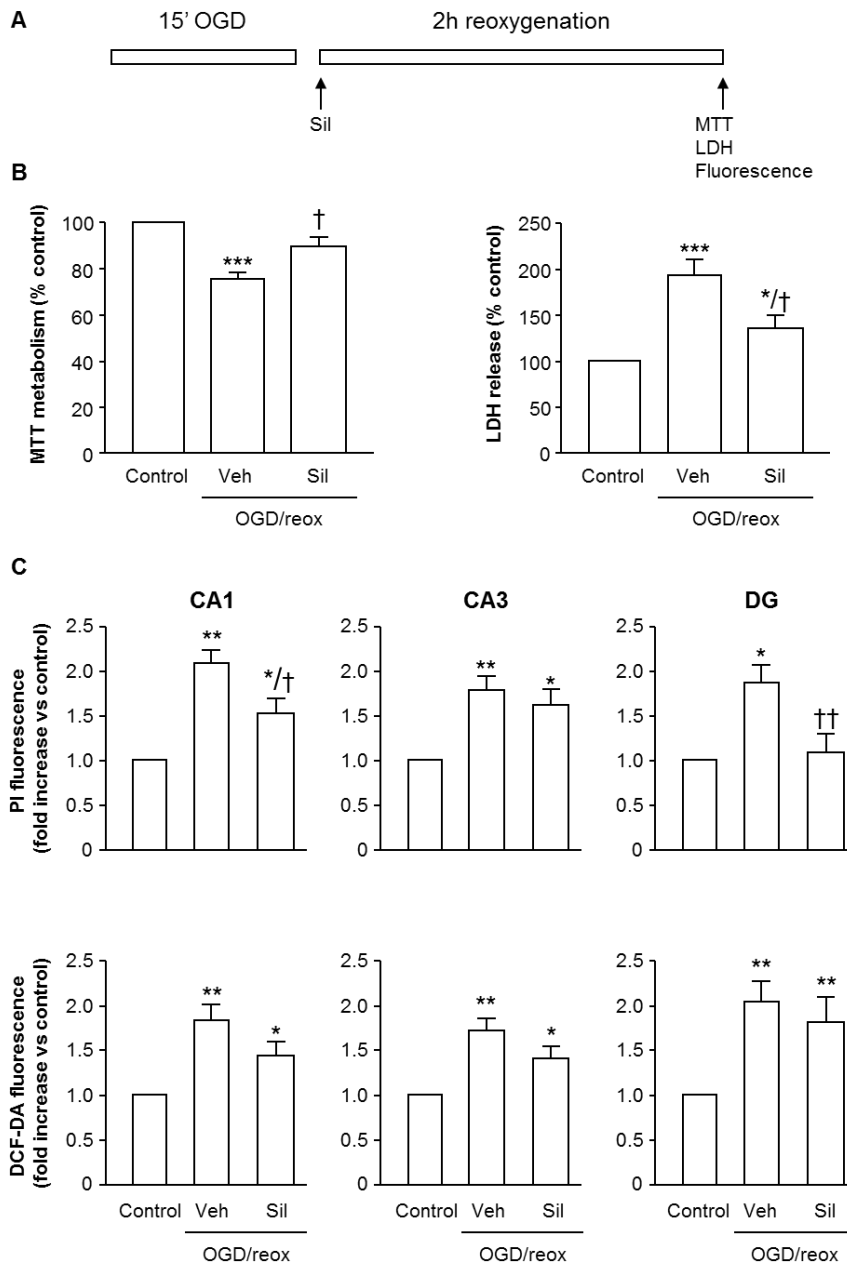


Figure 8. Sildenafil reduces cell death of hippocampal slices subjected to OGD and reoxygenation. Panel A. Slices were subjected to 15 min OGD followed by 2 h of reoxygenation in the absence (Veh) or presence of 10 μ M sildenafil (Sil). **Panel B.** At the end of the experiment, cell protection was measured by MTT or LDH release. Data are mean \pm S.E.M. (n=7-9). Statistical analysis yielded the following results: for MTT treatment: [F(2,18)=18.67;P< 0.001] and for LDH determination: [F(2,24)=13.57;P< 0.001]. **Panel C.** Quantitative measurements of propidium iodide showing cell viability and measure of ROS production by DCF-DA fluorescence in CA1, CA3 and DG. Data are mean \pm S.E.M (n=5-7). Statistical analysis of propidium iodide yielded the following results: for CA1: [F(2,12)=11.76;P< 0.01]; for CA3: [F(2,12)=7.797;P< 0.01] and for DG: [F(2,12)=8.567;P< 0.01].

3.9. Therapeutic window of sildenafil

Based on the protective effects of sildenafil against OGD/reox we decided to address whether it would also result neuroprotective if given after malonate injections and to establish its therapeutic window. For these experiments, sildenafil was administered intraperitoneally instead of orally because rats were still under the effects of anaesthesia. Analysis of lesion volumes revealed that sildenafil afforded a significant protection against malonate-induced neuronal death up to 3 h after the toxic insult (Fig. 9).

A

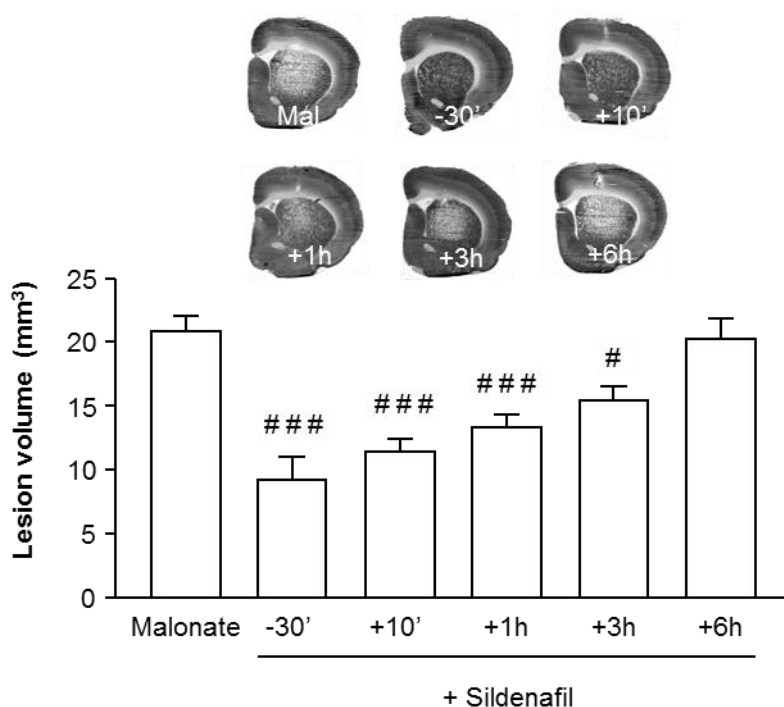


Figure 9. Therapeutic window of sildenafil. Panel A. Sildenafil (1.5 mg/kg p.o.) was administered before and after intrastriatal administration of malonate (1.5 μ mol/2 μ l). Rats were killed 72 h later. Representative cytochrome oxidase-stained slices and quantification of malonate-induced striatal lesions (mm³) show that the neurotoxic effect of malonate is attenuated by sildenafil. Data are mean \pm S.E.M (n=5-14 animals per group) [F(5,40)=12.76;P<0.001]. #P<0.05; ###P<0.001 vs. malonate.

4. Discussion

Based on the positive results shown by PDE5 inhibitors against ischemia in several organs [4, 5], studies are focusing on the therapeutic potential of this type of drugs for the treatment of cerebral stroke. Indeed, recent reports have shown that delayed sildenafil administration improves functional recovery in rats after stroke by enhancing angiogenesis, neurogenesis and improving neurologic function [6, 7, 9, 10]. In the present work we now report that sildenafil affords a significant protection against malonate-induced cell death, an effect still evident if administered up to 3 h after the toxic insult. Such beneficial effects appear to be mediated by the regulation of the calpain/p25/cdk5 signalling pathway. Moreover, increased phosphorylation of the prosurvival transcription factor MEF2 and the up-regulation of Bcl-2/Bax and Bcl-xL/Bax ratios caused by sildenafil may as well account for its neuroprotective effects.

Malonate, a reversible inhibitor of mitochondrial succinate dehydrogenase (SDH), produces a cell loss that mimics many of the biochemical and neuropathological features of stroke [13, 52]. In fact, malonate can trigger the generation of superoxide radicals, secondary excitotoxicity mediated by Ca^{2+} influx and apoptosis [14, 15]. Under our experimental conditions, malonate produced histological lesions that were significantly reduced by sildenafil. We had previously found no effect of sildenafil on ROS production (unpublished data), for this reason we focused our work on the other two mechanisms implicated in malonate neurotoxicity, namely excitotoxicity and apoptosis. Excitotoxicity has been postulated to underlie neuronal death due to cerebral ischemia [53] as well as a number of neurodegenerative disorders [54, 55, 56]. Activation of calpains is a major effector in the excitotoxic signal transduction cascade [38, 57, 58], and has been shown to be selectively activated in striatal neurons after malonate administration [59]. In agreement with this latter report, calpain activity was enhanced by malonate treatment, as demonstrated by increased levels of specific calpain-cleaved fodrin breakdown products, which began to accumulate as early as 30 minutes and maximized between 6 to 9 h after malonate. As demonstrated by our data, sildenafil significantly reversed the activation of

calpain induced by malonate, an effect independent of any direct inhibition of this protease by sildenafil [27].

Once activated, calpain is known to deregulate the normal function of cdk5. The activity of this kinase is regulated by the binding of one of its activator proteins, p35 or p39, which are cleaved by calpain [21, 22, 60]. Calpain-mediated truncation of p35 to p25 produces a more stable and active form of the protein, the p25/cdk5 complex, with an altered subcellular distribution [20, 61]. Aberrant activation of cdk5 following ischemic stroke is a key process leading to neuronal cell death [18, 19, 45, 59, 62]. Of interest, this pathway has also been associated with damaged neurones in brain tissue from stroke-affected patients [63]. In our model, malonate produced a significant increase of p25 that was accompanied by the translocation of cdk5 from the cytosol to the nucleus, effects that were significantly reduced by sildenafil. The implication of the calpain/p25/cdk5 pathway on malonate-induced cell death was further confirmed by using specific inhibitors of calpain or cdk5; which also afforded a significant protection against the toxic effects of malonate. Of interest, roscovitine also inhibited the activation of calpain. Such effect could be explained by the fact that the p25/cdk5 complex is known to phosphorylate NMDA receptors, thereby amplifying calcium influx and increasing the activation of excitotoxic molecular cascades [64].

Cdk5 overactivation by binding to p25 changes its substrate specificity producing the hyperphosphorylation of substrates not normally phosphorylated by this kinase and triggering a cascade of neurotoxic pathways [61, 65, 66]. Among other potential targets, the microtubule-associated protein tau has been proposed to be hyperphosphorylated by cdk5 following focal ischemia [67, 68]. Taking this into account, we then analyzed tau phosphorylation. Malonate-treated animals showed an increased phosphorylation of tau at Ser202/Ser205 (AT8 epitope) that was successfully reverted by sildenafil. Likewise, inhibition of calpain and cdk5 also reduced malonate-induced tauopathy, further supporting the key role of this deregulated kinase pathway in malonate induced cell death and in sildenafil afforded neuroprotection.

Myocyte enhancer factor 2 (MEF2) is a group of transcriptional factors required to regulate neuronal development, synaptic plasticity, as well as survival [69]. It has also been described that neurotoxicity induces destabilization of MEF2s in neurons caused by an increase in caspase-dependent cleavage of MEF2, an effect that requires nuclear activation of cdk5 activity [70-73]. Despite the translocation of cdk5 to the nucleus 6 h after malonate injection, we did not find any effect on MEF2 levels at this time point. It should be noted, however, the large decrease in MEF2 levels 72 h after malonate administration suggesting the possible cleavage and inactivation of this protein at some time point between 6 to 72 h. This effect was prevented by both, sildenafil and roscovitine, further supporting the regulation of calpain/cdk5/p25 by sildenafil as a plausible mechanism underlying its cytoprotective properties. As a critical survival protein, MEF2s are tightly regulated via posttranslational modifications. It is known that phosphorylation by kinases is an important process through which the activity of MEF2 is up- or down-regulated [74-76]. In this sense, phosphorylation of MEF2 at ser59 enhances its binding to the DNA and, consequently, its transcriptional activity [44, 77]. Of interest, p-MEF2 (ser59) levels were significantly increased in sildenafil-treated rats what could represent a new survival pathway activated by sildenafil with important implications to our model, as restoration of the active form of MEF2 has been proved to be protective following focal ischemia [45].

We also found that sildenafil increased the levels of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL in the striatum. The Bcl2 family of proteins is implicated in the regulation of apoptosis and comprises members that have either antiapoptotic or proapoptotic effects. While Bcl-2 and Bcl-xL play a critical role in mediating survival signals [78]; activation of Bax, by calpain cleavage, leads to cyt c release from the mitochondria to the cytosol triggering apoptosis [49-51, 79]. Although, we did not find any change in the subcellular location of Bax or cyt c 6 h after malonate injection, there is substantial evidence indicating that apoptosis is implicated in malonate-induced cell [13, 46, 47, 80, 81], what prevents us from ruling out the participation of apoptosis in our model. Instead, our results could be explained in terms of timing. In fact, activation of caspases was not detectable earlier than 6h after striatal malonate injection [13] or between 12 to 24 h after in vitro malonate addition [46]. At these time points after sildenafil administration, Bcl-2/Bax and Bcl-xL/Bax

ratios were significantly increased and it is known that Bcl-2 or Bcl-xL overexpression is sufficient to reduce malonate-induced apoptosis [13, 46, 47], what provides another mechanism by which sildenafil might have afforded a significant protection against malonate-induced neurotoxicity.

In the present study we also demonstrated that sildenafil, at a concentration shown to protect adult cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury [82], also protects hippocampal slices subjected to OGD. Noteworthy, in these experiments sildenafil was added at the time of reoxygenation. Based on these findings and on the fact that in the treatment of stroke the time window for administration of neuroprotective agents is a critical issue, we next analysed whether sildenafil would also protect against malonate-induced cell death if administered after the toxic insult, as in the OGD study. Sildenafil was effective when administered up to 3 h after striatal malonate injection. At this time point, NMDA antagonists, glutamate release inhibitors [83] or cdk5 inhibitors (this work, unpublished data) are no longer protective, what provides further significance to our findings.

In conclusion, our results show that sildenafil exerts neuroprotection not only in an *in vitro* model of oxygen and glucose deprivation (OGD) but also in a model of chemical hypoxia *in vivo*. This protective effect appears to be related to an inhibition of the calpain/p25/cdk5 pathway. Furthermore, our data point to the up-regulation of anti-apoptotic and prosurvival proteins as other plausible mechanisms underlying sildenafil neuroprotection (Fig. 10). Noteworthy, sildenafil showed an interesting therapeutic time window. Future studies using other animal models of stroke are warranted in order to exploit the possible therapeutic potential of sildenafil in preventing neuronal cell death following ischemia/reperfusion.

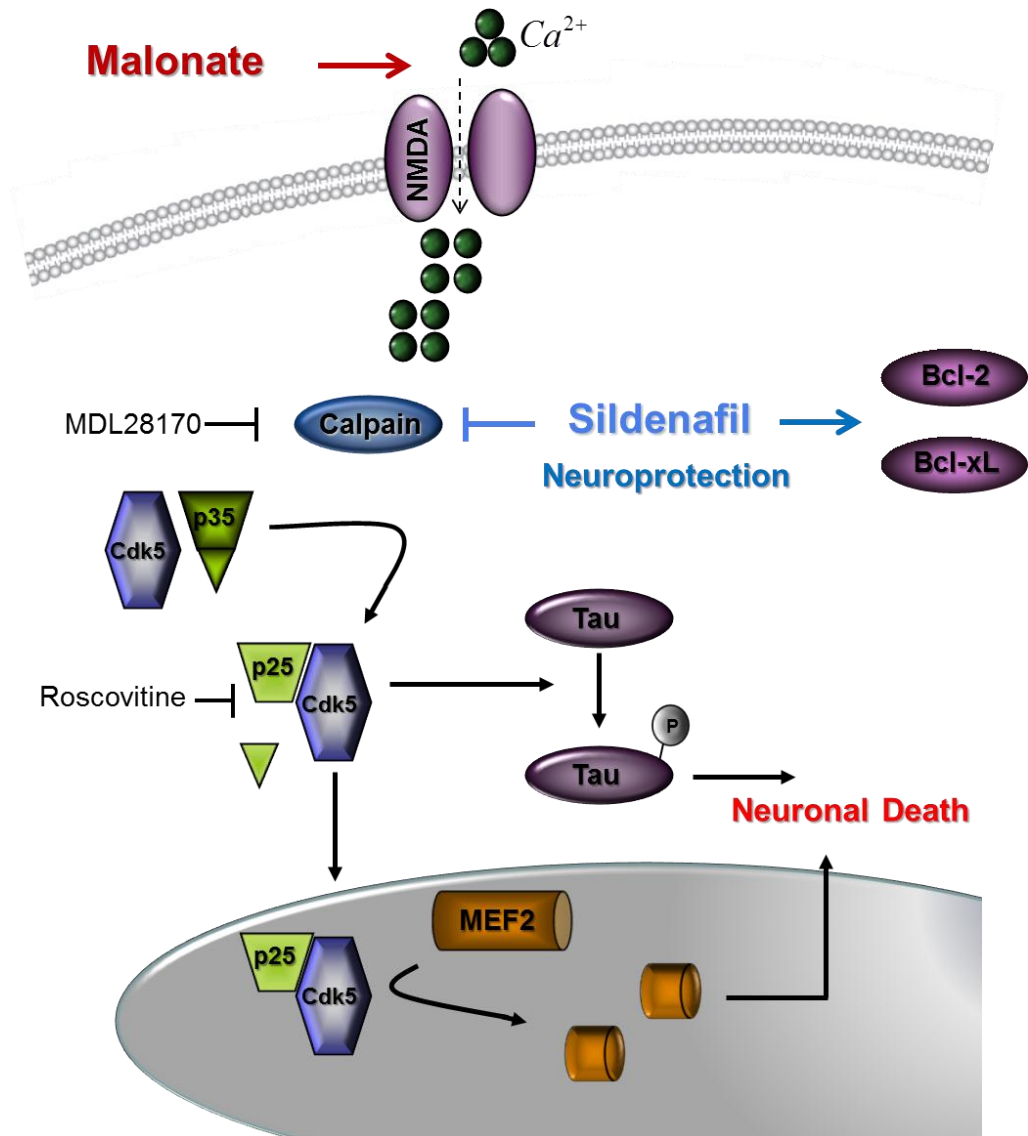


Figure 10. Proposed mechanisms underlying sildenafil neuroprotection against malonate induced neurotoxicity. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonate administration induces mitochondrial dysfunction, which results in calcium deregulation. The secondary excitotoxicity leads to the activation of calpain, which, in turn, is responsible of p35 cleavage to p25. The p25/cdk5 complex contributes to neuronal death by hyperphosphorylating tau in the cytosol and targeting MEF2 for its degradation within the nucleus. Sildenafil afforded protection appears to be related to the inhibition of the calpain/p25/cdk5 pathway and the up-regulation of anti-apoptotic proteins.

Acknowledgements

The authors are grateful to Sandra Lizaso, Mari Luz Muro and Vanessa Gómez-Rangel for technical assistance. They would also like to thank “Amigos de la Universidad de Navarra” for a fellowship to L.O. and L.B-M and Ramon Areces Foundation for a fellowship to E.P. This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-05143-C03-03).

Disclosure statement

None of the authors have any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the work submitted that could inappropriately influence their work.

References

- [1] A.T. Bender, J.A. Beavo, Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use, *Pharmacological reviews*, 58 (2006) 488-520.
- [2] A.T. Bender, J.A. Beavo, Specific localized expression of cGMP PDEs in Purkinje neurons and macrophages, *Neurochem Int*, 45 (2004) 853-857.
- [3] L. Wang, Z. Gang Zhang, R. Lan Zhang, M. Chopp, Activation of the PI3-K/Akt pathway mediates cGMP enhanced-neurogenesis in the adult progenitor cells derived from the subventricular zone, *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 25 (2005) 1150-1158.
- [4] D. Kouvelas, A. Goulas, G. Papazisis, C. Sardeli, C. Pourzitaki, PDE5 inhibitors: in vitro and in vivo pharmacological profile, *Current pharmaceutical design*, 15 (2009) 3464-3475.
- [5] R.C. Kukreja, F.N. Salloum, A. Das, S. Koka, R.A. Ockaili, L. Xi, Emerging new uses of phosphodiesterase-5 inhibitors in cardiovascular diseases, *Experimental and clinical cardiology*, 16 (2011) e30-35.
- [6] G. Ding, Q. Jiang, L. Li, L. Zhang, Z.G. Zhang, K.A. Ledbetter, S. Panda, S.P. Davarani, H. Athiraman, Q. Li, J.R. Ewing, M. Chopp, Magnetic resonance imaging investigation of axonal remodeling and angiogenesis after embolic stroke in sildenafil-treated rats, *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 28 (2008) 1440-1448.
- [7] L. Li, Q. Jiang, L. Zhang, G. Ding, Z. Gang Zhang, Q. Li, J.R. Ewing, M. Lu, S. Panda, K.A. Ledbetter, P.A. Whitton, M. Chopp, Angiogenesis and improved cerebral blood flow in the ischemic boundary area detected by MRI after administration of sildenafil to rats with embolic stroke, *Brain research*, 1132 (2007) 185-192.
- [8] F.S. Menniti, J. Ren, T.M. Coskran, J. Liu, D. Morton, D.K. Sietsma, A. Som, D.T. Stephenson, B.A. Tate, S.P. Finklestein, Phosphodiesterase 5A inhibitors improve functional recovery after stroke in rats: optimized dosing regimen with

- implications for mechanism, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 331 (2009) 842-850.
- [9] R. Zhang, Sildenafil (Viagra) Induces Neurogenesis and Promotes Functional Recovery After Stroke in Rats, *Stroke*, 33 (2002) 2675-2680.
- [10] L. Zhang, R.L. Zhang, Y. Wang, C. Zhang, Z.G. Zhang, H. Meng, M. Chopp, Functional recovery in aged and young rats after embolic stroke: treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor, *Stroke*, 36 (2005) 847-852.
- [11] R.L. Zhang, Z. Zhang, L. Zhang, Y. Wang, C. Zhang, M. Chopp, Delayed treatment with sildenafil enhances neurogenesis and improves functional recovery in aged rats after focal cerebral ischemia, *Journal of neuroscience research*, 83 (2006) 1213-1219.
- [12] B. Silver, S. McCarthy, M. Lu, P. Mitsias, A.N. Russman, A. Katramados, D.C. Morris, C.A. Lewandowski, M. Chopp, Sildenafil treatment of subacute ischemic stroke: a safety study at 25-mg daily for 2 weeks, *Journal of stroke and cerebrovascular diseases*, 18 (2009) 381-383.
- [13] J.B. Schulz, M. Weller, R.T. Matthews, M.T. Heneka, P. Groscurth, J.C. Martinou, J. Lommatzsch, R. von Coelln, U. Wullner, P.A. Loschmann, M.F. Beal, J. Dichgans, T. Klockgether, Extended therapeutic window for caspase inhibition and synergy with MK-801 in the treatment of cerebral histotoxic hypoxia, *Cell death and differentiation*, 5 (1998) 847-857.
- [14] A. Dedeoglu, R.J. Ferrante, O.A. Andreassen, W.H. Dillmann, M.F. Beal, Mice Overexpressing 70-kDa Heat Shock Protein Show Increased Resistance to Malonate and 3-Nitropropionic Acid, *Experimental neurology*, 176 (2002) 262-265.
- [15] J.G. Greene, J.T. Greenamyre, Manipulation of membrane potential modulates malonate-induced striatal excitotoxicity in vivo, *Journal of neurochemistry*, 66 (1996) 637-643.

- [16] M.M. Aarts, M. Arundine, M. Tymianski, Novel concepts in excitotoxic neurodegeneration after stroke, *Expert reviews in molecular medicine*, 5 (2003) 1-22.
- [17] M. Arundine, M. Tymianski, Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity, *Cell calcium*, 34 (2003) 325-337.
- [18] M. Slevin, J. Krupinski, Cyclin-dependent kinase-5 targeting for ischaemic stroke, *Current opinion in pharmacology*, 9 (2009) 119-124.
- [19] J. Rashidian, G. Iyirhiaro, H. Aleyasin, M. Rios, I. Vincent, S. Callaghan, R.J. Bland, R.S. Slack, M.J. During, D.S. Park, Multiple cyclin-dependent kinases signals are critical mediators of ischemia/hypoxic neuronal death in vitro and in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2005) 14080-14085.
- [20] G.N. Patrick, L. Zukerberg, M. Nikolic, S. de la Monte, P. Dikkes, L.H. Tsai, Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration, *Nature*, 402 (1999) 615-622.
- [21] M.S. Lee, Y.T. Kwon, M. Li, J. Peng, R.M. Friedlander, L.H. Tsai, Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain, *Nature*, 405 (2000) 360-364.
- [22] G. Kusakawa, T. Saito, R. Onuki, K. Ishiguro, T. Kishimoto, S. Hisanaga, Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25, *The Journal of biological chemistry*, 275 (2000) 17166-17172.
- [23] A. Camins, E. Verdaguer, J. Folch, M. Pallas, Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes, *CNS drug reviews*, 12 (2006) 135-148.
- [24] S. Timsit, B. Menn, Cerebral ischemia, cell cycle elements and Cdk5, *Biotechnology journal*, 2 (2007) 958-966.
- [25] B. Menn, S. Bach, T.L. Blevins, M. Campbell, L. Meijer, S. Timsit, Delayed treatment with systemic (S)-roscovitine provides neuroprotection and inhibits in vivo CDK5 activity increase in animal stroke models, *PloS one*, 5 (2010) e12117.

- [26] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York, (1997).
- [27] E. Puerta, I. Hervias, L. Barros-Minones, J. Jordan, A. Ricobaraza, M. Cuadrado-Tejedor, A. Garcia-Osta, N. Aguirre, Sildenafil protects against 3-nitropropionic acid neurotoxicity through the modulation of calpain, CREB, and BDNF, *Neurobiology of disease*, 38 (2010) 237-245.
- [28] S. Reagan-Shaw, M. Nihal, N. Ahmad, Dose translation from animal to human studies revisited, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22 (2008) 659-661.
- [29] B. Goni-Allo, M. Ramos, J. Jordan, N. Aguirre, In vivo studies on the protective role of minocycline against excitotoxicity caused by malonate or N-methyl-d-aspartate, *Experimental neurology*, 191 (2005) 326-330.
- [30] A. Garcia-Osta, J. Del Rio, D. Frechilla, Increased CRE-binding activity and tryptophan hydroxylase mRNA expression induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") in the rat frontal cortex but not in the hippocampus, *Brain research. Molecular brain research*, 126 (2004) 181-187.
- [31] F. Pallotti, G. Lenaz, Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines, *Methods in cell biology*, 80 (2007) 3-44.
- [32] C. Vijayvergiya, M.F. Beal, J. Buck, G. Manfredi, Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice, *The Journal of neuroscience*, 25 (2005) 2463-2470.
- [33] B. Goni-Allo, E. Puerta, B.O. Mathuna, I. Hervias, B. Lasheras, R. de la Torre, N. Aguirre, On the role of tyrosine and peripheral metabolism in 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin neurotoxicity in rats, *Neuropharmacology*, 54 (2008) 885-900.
- [34] J. Egea, A.O. Rosa, M. Sobrado, L. Gandia, M.G. Lopez, A.G. Garcia, Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal

- slices is lost in alpha7 nicotinic receptor knockout mice, *Neuroscience*, 145 (2007) 866-872.
- [35] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65 (1983) 55-63.
- [36] M. Sobrado, J.M. Roda, M.G. Lopez, J. Egea, A.G. Garcia, Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation, *Neuroscience letters*, 365 (2004) 132-136.
- [37] H.C. Ha, P.M. Woster, J.D. Yager, R.A. Casero, Jr., The role of polyamine catabolism in polyamine analogue-induced programmed cell death, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (1997) 11557-11562.
- [38] I.M. Araujo, B.P. Carreira, C.M. Carvalho, A.P. Carvalho, Calpains and delayed calcium deregulation in excitotoxicity, *Neurochemical research*, 35 (2010) 1966-1969.
- [39] K. Szydlowska, M. Tymianski, Calcium, ischemia and excitotoxicity, *Cell calcium*, 47 (2010) 122-129.
- [40] M.J. O'Hare, N. Kushwaha, Y. Zhang, H. Aleyasin, S.M. Callaghan, R.S. Slack, P.R. Albert, I. Vincent, D.S. Park, Differential roles of nuclear and cytoplasmic cyclin-dependent kinase 5 in apoptotic and excitotoxic neuronal death, *The Journal of neuroscience*, 25 (2005) 8954-8966.
- [41] A. Rami, D. Ferger, J. Kriegstein, Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity, *Neuroscience research*, 27 (1997) 93-97.
- [42] L. Meijer, A. Borgne, O. Mulner, J.P. Chong, J.J. Blow, N. Inagaki, M. Inagaki, J.G. Delcros, J.P. Moulinoux, Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5, *European journal of biochemistry / FEBS*, 243 (1997) 527-536.

- [43] J.C. Augustinack, A. Schneider, E.M. Mandelkow, B.T. Hyman, Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease, *Acta neuropathologica*, 103 (2002) 26-35.
- [44] C.P. Emerson, Myogenesis and developmental control genes, *Current opinion in cell biology*, 2 (1990) 1065-1075.
- [45] J. Rashidian, M.W. Rousseaux, K. Venderova, D. Qu, S.M. Callaghan, M. Phillips, R.J. Bland, M.J. During, Z. Mao, R.S. Slack, D.S. Park, Essential role of cytoplasmic cdk5 and Prx2 in multiple ischemic injury models, in vivo, *The Journal of neuroscience*, 29 (2009) 12497-12505.
- [46] M. Gomez-Lazaro, M.F. Galindo, R.M. Melero-Fernandez de Mera, F.J. Fernandez-Gomez, C.G. Concannon, M.F. Segura, J.X. Comella, J.H. Prehn, J. Jordan, Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activate Bax to induce mitochondrial cytochrome c release and apoptosis in response to malonate, *Molecular pharmacology*, 71 (2007) 736-743.
- [47] F.J. Fernandez-Gomez, M.F. Galindo, M. Gomez-Lazaro, V.J. Yuste, J.X. Comella, N. Aguirre, J. Jordan, Malonate induces cell death via mitochondrial potential collapse and delayed swelling through an ROS-dependent pathway, *British journal of pharmacology*, 144 (2005) 528-537.
- [48] L. Yang, S. Sugama, R.P. Mischak, M. Kiaei, N. Bizat, E. Brouillet, T.H. Joh, M.F. Beal, A novel systemically active caspase inhibitor attenuates the toxicities of MPTP, malonate, and 3NP in vivo, *Neurobiology of disease*, 17 (2004) 250-259.
- [49] R.C. Taylor, S.P. Cullen, S.J. Martin, Apoptosis: controlled demolition at the cellular level, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9 (2008) 231-241.
- [50] S.J. Korsmeyer, M.C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K.J. Oh, P.H. Schlesinger, Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c, *Cell death and differentiation*, 7 (2000) 1166-1173.
- [51] L. Galluzzi, K. Blomgren, G. Kroemer, Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury, *Nature reviews. Neuroscience*, 10 (2009) 481-494.

- [52] R. Henshaw, B.G. Jenkins, J.B. Schulz, R.J. Ferrante, N.W. Kowall, B.R. Rosen, M.F. Beal, Malonate produces striatal lesions by indirect NMDA receptor activation, *Brain research*, 647 (1994) 161-166.
- [53] M. Arundine, M. Tymianski, Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61 (2004) 657-668.
- [54] M.M. Fan, L.A. Raymond, N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease, *Progress in neurobiology*, 81 (2007) 272-293.
- [55] A. Lau, M. Tymianski, Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration, *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 460 (2010) 525-542.
- [56] E.A. Waxman, D.R. Lynch, N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease, *The Neuroscientist*, 11 (2005) 37-49.
- [57] J. Takano, M. Tomioka, S. Tsubuki, M. Higuchi, N. Iwata, S. Itohara, M. Maki, T.C. Saido, Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastatin mutant mice, *The Journal of biological chemistry*, 280 (2005) 16175-16184.
- [58] J. Jordan, M.F. Galindo, R.J. Miller, Role of calpain- and interleukin-1 beta converting enzyme-like proteases in the beta-amyloid-induced death of rat hippocampal neurons in culture, *Journal of neurochemistry*, 68 (1997) 1612-1621.
- [59] R. Nath, M. Davis, A.W. Probert, N.C. Kupina, X. Ren, G.P. Schielke, K.K. Wang, Processing of cdk5 activator p35 to its truncated form (p25) by calpain in acutely injured neuronal cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 274 (2000) 16-21.
- [60] H. Patzke, L.H. Tsai, Calpain-mediated cleavage of the cyclin-dependent kinase-5 activator p39 to p29, *The Journal of biological chemistry*, 277 (2002) 8054-8060.
- [61] S. Hisanaga, R. Endo, Regulation and role of cyclin-dependent kinase activity in neuronal survival and death, *Journal of neurochemistry*, 115 (2010) 1309-1321.

- [62] J. Wang, S. Liu, Y. Fu, J.H. Wang, Y. Lu, Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors, *Nature neuroscience*, 6 (2003) 1039-1047.
- [63] N. Mitsios, R. Pennucci, J. Krupinski, C. Sanfeliu, J. Gaffney, P. Kumar, S. Kumar, O. Juan-Babot, M. Slevin, Expression of cyclin-dependent kinase 5 mRNA and protein in the human brain following acute ischemic stroke, *Brain Pathol*, 17 (2007) 11-23.
- [64] B.S. Li, M.K. Sun, L. Zhang, S. Takahashi, W. Ma, L. Vinade, A.B. Kulkarni, R.O. Brady, H.C. Pant, Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (2001) 12742-12747.
- [65] J. Kanungo, Y.L. Zheng, N.D. Amin, H.C. Pant, Targeting Cdk5 activity in neuronal degeneration and regeneration, *Cellular and molecular neurobiology*, 29 (2009) 1073-1080.
- [66] A. Camins, E. Verdaguer, J. Folch, A.M. Canudas, M. Pallas, The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration, *Drug news & perspectives*, 19 (2006) 453-460.
- [67] Y. Wen, S.H. Yang, R. Liu, E.J. Perez, A.M. Brun-Zinkernagel, P. Koulen, J.W. Simpkins, Cdk5 is involved in NFT-like tauopathy induced by transient cerebral ischemia in female rats, *Biochimica et biophysica acta*, 1772 (2007) 473-483.
- [68] M. Morioka, T. Kawano, S. Yano, Y. Kai, H. Tsuiki, Y. Yoshinaga, J. Matsumoto, T. Maeda, J. Hamada, H. Yamamoto, K. Fukunaga, J. Kuratsu, Hyperphosphorylation at serine 199/202 of tau factor in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia, *Biochemical and biophysical research communications*, 347 (2006) 273-278.
- [69] K.A. Heidenreich, D.A. Linseman, Myocyte enhancer factor-2 transcription factors in neuronal differentiation and survival, *Molecular neurobiology*, 29 (2004) 155-166.

- [70] X. Tang, X. Wang, X. Gong, M. Tong, D. Park, Z. Xia, Z. Mao, Cyclin-dependent kinase 5 mediates neurotoxin-induced degradation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2, *The Journal of neuroscience*, 25 (2005) 4823-4834.
- [71] X. Gong, X. Tang, M. Wiedmann, X. Wang, J. Peng, D. Zheng, L.A. Blair, J. Marshall, Z. Mao, Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis, *Neuron*, 38 (2003) 33-46.
- [72] E. Verdaguer, D. Alvira, A. Jimenez, V. Rimbau, A. Camins, M. Pallas, Inhibition of the cdk5/MEF2 pathway is involved in the antiapoptotic properties of calpain inhibitors in cerebellar neurons, *British journal of pharmacology*, 145 (2005) 1103-1111.
- [73] S. Okamoto, Z. Li, C. Ju, M.N. Scholzke, E. Mathews, J. Cui, G.S. Salvesen, E. Bossy-Wetzell, S.A. Lipton, Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (2002) 3974-3979.
- [74] S. Gregoire, A.M. Tremblay, L. Xiao, Q. Yang, K. Ma, J. Nie, Z. Mao, Z. Wu, V. Giguere, X.J. Yang, Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation, *The Journal of biological chemistry*, 281 (2006) 4423-4433.
- [75] D.M. Cox, M. Du, M. Marback, E.C. Yang, J. Chan, K.W. Siu, J.C. McDermott, Phosphorylation motifs regulating the stability and function of myocyte enhancer factor 2A, *The Journal of biological chemistry*, 278 (2003) 15297-15303.
- [76] Y. Yin, H. She, W. Li, Q. Yang, S. Guo, Z. Mao, Modulation of Neuronal Survival Factor MEF2 by Kinases in Parkinson's Disease, *Frontiers in physiology*, 3 (2012) 171.
- [77] J.D. Molkentin, L. Li, E.N. Olson, Phosphorylation of the MADS-Box transcription factor MEF2C enhances its DNA binding activity, *The Journal of biological chemistry*, 271 (1996) 17199-17204.

- [78] B. Levine, S. Sinha, G. Kroemer, Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy, *Autophagy*, 4 (2008) 600-606.
- [79] M.E. Gibson, B.H. Han, J. Choi, C.M. Knudson, S.J. Korsmeyer, M. Parsadanian, D.M. Holtzman, BAX contributes to apoptotic-like death following neonatal hypoxia-ischemia: evidence for distinct apoptosis pathways, *Mol Med*, 7 (2001) 644-655.
- [80] S. Toulmond, K. Tang, Y. Bureau, H. Ashdown, S. Degen, R. O'Donnell, J. Tam, Y. Han, J. Colucci, A. Giroux, Y. Zhu, M. Boucher, B. Pikounis, S. Xanthoudakis, S. Roy, M. Rigby, R. Zamboni, G.S. Robertson, G.Y. Ng, D.W. Nicholson, J.P. Fluckiger, Neuroprotective effects of M826, a reversible caspase-3 inhibitor, in the rat malonate model of Huntington's disease, *British journal of pharmacology*, 141 (2004) 689-697.
- [81] O.A. Andreassen, R.J. Ferrante, D.B. Hughes, P. Klivenyi, A. Dedeoglu, V.O. Ona, F. R.M., M.F. Beal, Malonate and 3-Nitropropionic Acid Neurotoxicity Are Reduced in Transgenic Mice Expressing a Caspase-1 Dominant-Negative Mutant, *Journal of neurochemistry*, 75 (2000) 847 -852.
- [82] A. Das, L. Xi, R.C. Kukreja, Protein kinase G-dependent cardioprotective mechanism of phosphodiesterase-5 inhibition involves phosphorylation of ERK and GSK3beta, *The Journal of biological chemistry*, 283 (2008) 29572-29585.
- [83] J.B. Schulz, R.T. Matthews, B.G. Jenkins, P. Brar, M.F. Beal, Improved therapeutic window for treatment of histotoxic hypoxia with a free radical spin trap, *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 15 (1995) 948-952.

Capítulo V

Capítulo 5

Discusión General

*A veces me siento a pensar,
y la solución se presenta sola.*

Henry Jones

Los accidentes cerebrovasculares suponen en la actualidad el primer motivo de discapacidad en adultos y la segunda causa de mortalidad en el mundo. A pesar de los avances en la comprensión de la fisiopatología de la **isquemia cerebral** y de los numerosos ensayos clínicos realizados en los últimos años, no existe, a día de hoy, un tratamiento eficaz para esta patología. La utilización de modelos animales que mimeticen estos procesos es, por tanto, de gran utilidad a la hora de poder desarrollar nuevas terapias farmacológicas. En el presente trabajo se ha utilizado el **malonato**, inhibidor reversible del complejo II mitocondrial, cuya administración intraestriatal produce lesiones excitotóxicas similares a las observadas en la isquemia focal (1).

El **estrés oxidativo** y la **excitotoxicidad** constituyen dos de los eventos principales de la cascada isquémica. La activación de proteasas como la calpaína, la alteración funcional de cdk5 y la activación de la vía de las SAPKs han sido ampliamente señaladas como responsables de la **muerte neuronal** en numerosos procesos neurodegenerativos. Tanto es así, que se ha considerado la posibilidad de utilizar inhibidores específicos de estas proteínas en el tratamiento de diversas patologías entre las que se incluyen los accidentes cerebrovasculares (2-4).

Por otra parte, estudios recientes han demostrado que los PDE5i presentan efectos protectores en distintos modelos de neurodegeneración (5-7). En concreto, se ha descrito que el **sildenafil** mejora la recuperación en ratas que han sufrido un ictus a través del incremento de la angiogénesis, la neurogénesis y la mejora de la función neurológica (8-11). A pesar de estas evidencias, los estudios destinados a comprender el mecanismo que subyace a este efecto neuroprotector en modelos de isquemia cerebral son escasos.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, **en el presente trabajo se ofrecen nuevas evidencias sobre el efecto neuroprotector del sildenafil y se identifican las principales cascadas de señalización intracelular implicadas en este efecto beneficioso.** En primer lugar, demostramos que el sildenafil, administrado 30 minutos antes que el malonato, protege frente a la muerte neuronal inducida por la administración intraestriatal de esta toxina en ratas. La dosis de sildenafil utilizada en este trabajo (1,5 mg/kg p.o. o i.p.) equivale a un comprimido de Viagra® de 20 mg (12); dosis utilizada en el tratamiento

de la hipertensión pulmonar en humanos. Por otro lado, demostramos, por primera vez, que el sildenafil protege de la neurodegeneración inducida por la privación de oxígeno y glucosa en rodajas de hipocampo cuando éste es administrado durante la fase de reoxigenación.

Con el objetivo de desentrañar los mecanismos responsables de la neuroprotección observada, nos propusimos estudiar el efecto del sildenafil sobre los principales mecanismos que conllevan a la muerte celular tras la disrupción mitocondrial inducida por el malonato. Mecanismos que, como se ha comentado en la introducción, son también fundamentales en la muerte celular derivada de la isquemia cerebral (13).

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es la principal causa de lesión tisular tras una isquemia cerebral (14, 15) y constituye una característica clave de la neurotoxicidad inducida por el malonato (16, 17). Si bien es cierto que estudios previos realizados por nuestro equipo de investigación y otros grupos describen un efecto antioxidante del sildenafil (18-21); en los dos modelos de daño cerebral utilizados en esta tesis doctoral, el sildenafil no fue capaz de revertir la producción de ROS ni 3-nitrotirosina, descartando la actividad antioxidante como uno de los mecanismos implicados en el efecto neuroprotector observado.

Las ROS son importantes mensajeros intracelulares, responsables de la activación de numerosas vías que desencadenan la muerte neuronal. Entre ellas destaca la vía de las SAPKs. En efecto, tras la administración de malonato observamos una disminución significativa de la forma inactiva de ASK-1, proteína responsable de la activación de JNK y p38 a través de la fosforilación y activación de las cinasas MKK7 y MKK3/6 respectivamente. La activación de esta cascada se traduce en una rápida e importante activación de ambas proteínas. En concreto, la translocación de p38 al núcleo se produce en los primeros minutos que siguen a la administración de la toxina. La activación de JNK por fosforilación se observa poco tiempo después y ambas proteínas alcanzan niveles máximos de activación a las 3/6 h. La selección del tiempo de estudio para los siguientes experimentos (6 h después de la administración de malonato) se realizó en base a estas

observaciones. El sildenafil, por su parte, devuelve la fosforilación inhibitoria de ASK-1 (ser83) a valores control, bloqueando así la activación de toda la cascada de señalización inducida por el malonato. Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación han mostrado que el sildenafil aumenta la fosforilación de la proteína Akt en el cerebro (22, 23), efecto que depende directamente de la vía de señalización intracelular de la PI3K. Esta vía es fundamental en diferentes cascadas de supervivencia celular (24) y, en este sentido, Akt es una de las cinasas responsables de fosforilar ASK-1 en la serina 83. Por tanto, y a pesar de que no ha sido objeto de estudio en este proyecto, la vía PI3K/Akt/ASK-1 podría estar participando en los mecanismos de protección del sildenafil en este modelo de hipoxia química.

Los resultados obtenidos utilizando inhibidores selectivos de p38 y JNK apoyan la implicación de la vía **ASK-1/MKK3/6/p38** tanto en la neurotoxicidad inducida por el malonato como en los efectos neuroprotectores del sildenafil. Éste, además, es capaz de revertir la activación de la vía ASK-1/MKK7/JNK/c-jun provocada por el malonato. Dicho efecto no parece ser crucial en los mecanismos responsables del daño neuronal obtenidos en este modelo, puesto que la inhibición selectiva de JNK no se tradujo en una menor lesión del complejo estriado de las ratas. Sin embargo, que el sildenafil inhiba dicha vía de señalización no carece de relevancia ya que JNK es un reconocido mediador de muerte neuronal en distintos modelos de enfermedades neurodegenerativas (25, 26).

Cabe destacar que la inhibición de p38 con SB203580, disminuyó la fosforilación de JNK y c-jun inducidas por el malonato. Este efecto, en principio no esperado, podría atribuirse a un efecto secundario del inhibidor, puesto que dosis elevadas de SB203580 pueden afectar a la activación de JNK (27). En cualquier caso, tal y como revisan Boutros y col., las vías de las MAPKs no son independientes y existen muchas conexiones entre las distintas proteínas (28). Por tanto, aunque no se ha descrito anteriormente, no podemos excluir la existencia de una posible conexión entre JNK y p38 en este modelo.

Excitotoxicidad

El fallo energético producido por el malonato genera una excitotoxicidad secundaria mediada por la entrada masiva de calcio lo que provoca la activación de la(s) calpaína(s), proteasas cuya activación se puede cuantificar midiendo los productos específicos resultantes de la degradación de la proteína α -espectrina (29). En nuestras condiciones experimentales, la acumulación de dichos fragmentos se hace patente en los primeros 30 minutos tras la administración del malonato, tal y como sucedía con p38; haciéndose máxima entre las 6 y 9 horas posteriores. El incremento patológico de la actividad proteolítica de la calpaína tiene como consecuencia, entre otras, la alteración de la proteína cdk5 (30, 31). Esta cinasa se encuentra normalmente regulada por la proteína p35. Sin embargo, su procesamiento por la calpaína da lugar a un fragmento más estable, p25, lo que origina un complejo p25/cdk5 que se caracteriza por tener alterada tanto la actividad como la localización intracelular (32, 33). Efectos que se han relacionado directamente con la muerte neuronal asociada a la isquemia cerebral (34-37). Tras la administración del malonato, observamos un aumento significativo de p25 que se acompaña de la disminución en los niveles de p35 y de la translocación al núcleo de cdk5. Además, a nivel citosólico, la activación de la vía calpaína/p25/cdk5 es responsable de la hiperfosforilación de la proteína tau, lo que contribuye a una menor estabilidad del citoesqueleto neuronal y a la alteración del transporte axonal, favoreciendo el desequilibrio de la homeostasis necesaria para la viabilidad celular. Por otro lado, a nivel nuclear, se ha descrito que cdk5 fosforila el factor de transcripción MEF-2, convirtiéndolo en diana de la caspasa-3 para su degradación (38-41). Efectivamente, los niveles de MEF-2 se encontraron disminuidos 72 h después de la administración del malonato, sugiriendo la posible degradación e inactivación de esta proteína implicada en fenómenos de supervivencia. Cabe destacar que 6 h después de la administración del malonato no observamos ningún efecto sobre la integridad de MEF-2; lo que podría sugerir que a este tiempo la caspasa-3 aun no está activada. Este dato concuerda con la ausencia de los fragmentos de α -espectrina específicos de caspasa-3 (120 kDa) en ese mismo tiempo. El sildenafil, por su parte, aumenta los niveles de fosforilación de **MEF-2** en la ser-59, fosforilación conocida por aumentar la actividad transcripcional de esta proteína y que, por

tanto, podría formar parte del conjunto de mecanismos que intervienen en la neuroprotección ejercida por este PDE5i.

Los resultados obtenidos demuestran que el sildenafilo revierte la activación de calpaína inducida por el malonato. Efecto que no parece ser consecuencia de la inhibición directa de la proteasa tal y como indican resultados *in vitro* realizados en nuestro laboratorio con anterioridad (5). El sildenafilo estaría bloqueando o impidiendo un paso previo necesario para la activación de dicha proteasa. Como consecuencia de esta inhibición, el sildenafilo disminuye la proteólisis de p35, impidiendo la alteración funcional de cdk5 y sus consecuencias: hiperfosforilación de tau y degradación de MEF-2. Dicha aseveración viene respaldada por los resultados obtenidos con los inhibidores selectivos de calpaína y cdk5 y que nos permiten sugerir que **la vía calpaína/p25/cdk5** está implicada tanto en el efecto tóxico del malonato como en la neuroprotección ejercida por el sildenafilo.

Curiosamente, la inhibición de cdk5 con roscovitina fue capaz de disminuir la activación de calpaína, efecto que puede ser explicado si tenemos en cuenta que el complejo p25/cdk5 activa los receptores NMDA provocando una mayor entrada de calcio y la amplificación de las cascadas activadas por procesos excitotóxicos (42). Otra explicación podría radicar en el fenómeno de propagación: si bloqueamos la muerte neuronal en un punto determinado de las vías intracelulares, evitamos que nuevas vías de señalización retroalimenten los fenómenos de excitotoxicidad, estrés oxidativo y apoptosis.

Apoptosis

La muerte apoptótica es un fenómeno característico de la penumbra isquémica. Rescatar a las neuronas destinadas a sufrir este proceso puede ser determinante a la hora de detener la propagación de la lesión. Los eventos que constituyen la cascada isquémica y las vías de señalización descritas en esta tesis doctoral pueden desembocar en una muerte neuronal por apoptosis. Así, la activación de calpaína está implicada en la activación de las proteínas proapoptóticas Bax y Bid (43-45) y la inhibición de MEF-2 contribuye a la muerte neuronal por apoptosis (46, 47, 39, 38); mientras que el normal funcionamiento de cdk5

parece ejercer un efecto protector frente a la muerte neuronal a través de la activación de Bcl-2 (48, 49). Por su parte, p38 es también responsable de la activación de Bax (50, 51); efecto que ha sido descrito tras la administración del malonato (52). Por ello y con el objetivo de continuar profundizando en la comprensión de los mecanismos de neuroprotección del sildenafil, se cuantificaron los niveles de Bcl-2, Bcl-xL y Bax tras una única administración de este PDE5i. Nuestros datos indican que una posible estimulación de la **síntesis de proteínas anti-apoptóticas**, tal y como refleja el incremento de los ratios Bcl-2/Bax y Bcl-xL/Bax, podría también estar mediando el efecto neuroprotector inducido por el sildenafil. La familia de proteínas Bcl-2 comprende miembros que juegan papeles muy diferentes en el control de la muerte celular por apoptosis. Mientras que Bcl-2 y Bcl-xL tienen un papel crítico mediando señales de supervivencia (53); proteínas como Bax o Bid son responsables de la formación del PPTM y la liberación del cyt c al citosol (54, 45, 47, 55). Si bien, 6 h después de la administración del malonato no observamos cambios en la localización intracelular de Bax o cyt c, no podemos descartar la implicación de la apoptosis en los mecanismo de neurotoxicidad puesto que son numerosos los artículos que describen la implicación de este fenómeno en la muerte neuronal inducida por esta toxina (52, 1, 16, 56, 57). En concordancia con los resultados obtenidos en la degradación de MEF-2, estos resultados podrían explicarse en términos de tiempo. En efecto, otros autores han descrito que la activación de caspasas no se evidencia hasta 6 h después de la administración intraestriatal del malonato (1) o entre las 12 y 24 h posteriores a su adición a cultivos celulares (52).

Ventana terapéutica

El factor tiempo es crucial cuando nos referimos a la progresión y consecuencias de una isquemia cerebral. La ventana terapéutica define el periodo de tiempo durante el cual la aplicación de un tratamiento puede reducir la lesión y mejorar la recuperación neurológica y funcional del paciente que ha sufrido una isquemia cerebral. Con el fin de determinar la posible utilidad terapéutica del sildenafil, se realizó un estudio preliminar en rodajas de hipocampo sometidas a privación de oxígeno y glucosa a las que se administró sildenafil tras el período de anoxia. El resultado positivo de este experimento

nos animó a establecer la ventana terapéutica en el modelo *in vivo* de malonato. Confirmamos que el sildenafil protege de la muerte neuronal inducida por la toxina cuando es administrado 30 minutos antes y hasta 3 horas después de la administración del malonato. Cabe destacar, la correlación temporal de este efecto con las vías descritas en este proyecto. Parece lógico que una vez alcanzados los niveles máximos de activación de estas cascadas, la reversión ya no sea posible.

Otros autores, utilizando distintos modelos animales de isquemia cerebral, han observado mejoras en la recuperación de la función neurológica situando la ventana terapéutica del sildenafil en más de 24 h, pero sin lograr cambios en el volumen de lesión (10, 11, 58, 8). Esto sugiere que también estarían entrando en juego otros mecanismos de recuperación distintos al bloqueo de la progresión de la lesión (neuroprotección). Estos serían, entre otros: angiogénesis, neurogénesis, sinaptogénesis y mejora del riego sanguíneo cerebral. Tal como recoge Bednar (59) en una interesante revisión, estaríamos hablando de un posible efecto neurorestaurador del sildenafil, en el que entran en juego mecanismos de recuperación del tejido cerebral dañado.

La figura 12 recoge las principales cascadas implicadas en el efecto neuroprotector del sildenafil descritas en este proyecto.

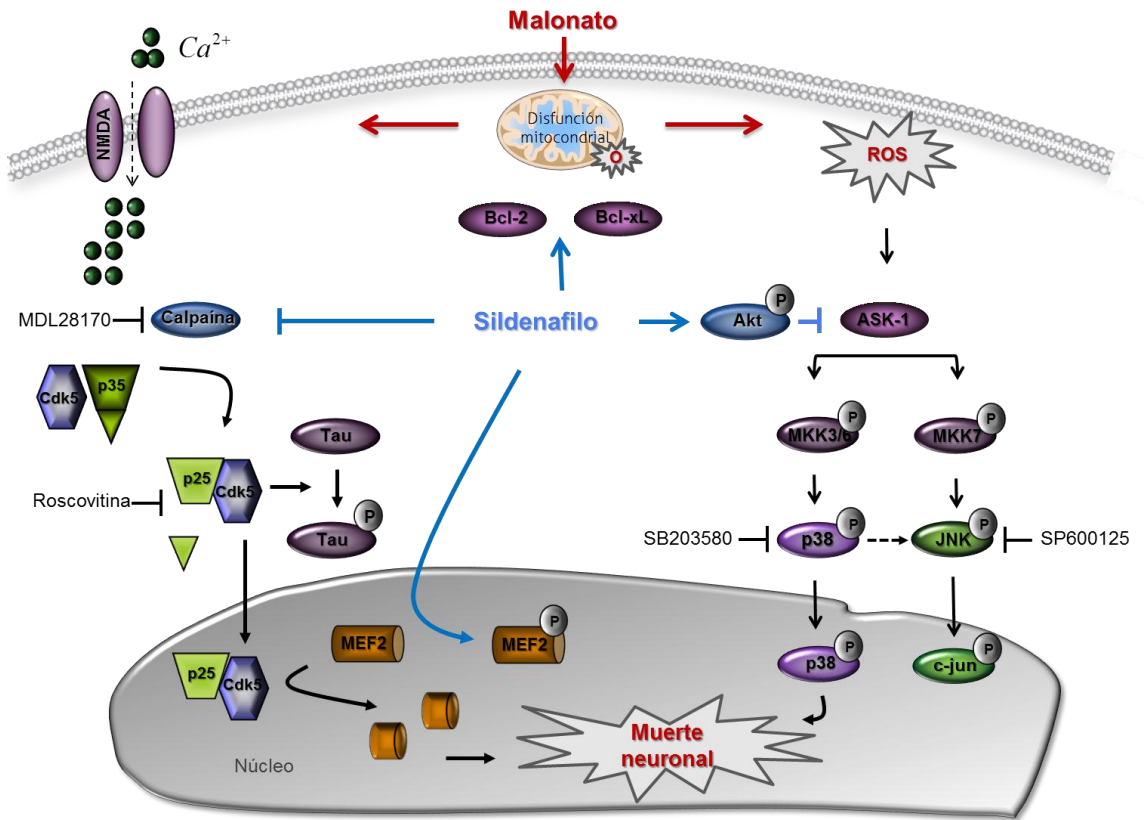


Figura 12. Representación esquemática de las principales vías de señalización implicadas en la neuroprotección ejercida por el sildenafil frente a la muerte neuronal inducida por el malonato. La administración de la toxina mitocondrial malonato produce excitotoxicidad y aumento en la producción de ROS. El sildenafil revierte la activación de las vías ASK-1/MKK3/6/p38 y calpaína/p25/cdk5 implicadas en la neurotoxicidad del malonato. Además, aumenta la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL, así como la fosforilación del factor de supervivencia MEF-2; procesos que pueden estar participando en el efecto beneficioso del sildenafil. →: Activación; †: Inhibición.

Cuestiones por resolver

Los resultados obtenidos en el presente proyecto abren nuevas incógnitas y señalan el camino hacia futuros experimentos. Es importante destacar que los procesos de excitotoxicidad, estrés oxidativo y apoptosis no constituyen fenómenos aislados, sino que numerosos estudios afirman que se trata de procesos interconectados. En este sentido, tanto la administración de sildenafil como de los inhibidores específicos de p38, calpaína y cdk5 presentaron niveles de neuroprotección similares. Esta observación nos hace pensar que las vías de señalización estudiadas podrían estar formando parte de la misma compleja cascada de señalización intracelular.

Por otro lado, queda en el aire definir el paso previo a la activación de calpaína en el que estaría actuando el sildenafil. La calpaína se activa mayoritariamente por un incremento intracelular de Ca^{2+} . Existen numerosos mecanismos destinados a regular las concentraciones y flujos del calcio en el interior de las células. Entre ellos, los canales de potasio han sido señalados en la última década como responsables de la protección frente a la muerte celular en diversos modelos de isquemia (60-62). La apertura de estos canales provoca la hiperpolarización de las membranas celulares, lo que disminuye finalmente la excitabilidad celular y, como consecuencia, la entrada de calcio a través de los canales NMDA (63-65). Estudios recientes han descrito que el sildenafil activa tanto los canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}), como los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}); efectos derivados de la activación de la vía cGMP/PKG y que median la disminución de la lesión cardíaca producida tras un infarto (66, 61) así como el efecto neuroprotector del sildenafil frente a neurotoxinas como la MDMA (22). Si la apertura de estos mismos canales participa en el efecto protector del sildenafil frente al daño neuronal producido por el malonato es un aspecto que queda por aclarar en futuras investigaciones.

Es importante señalar que a los efectos beneficiosos del sildenafil demostrados a nivel del SNC, se le suma la ventaja de ser un fármaco ya utilizado en terapéutica. Esto supone una serie de ventajas y aspectos favorables a la hora de llevarlo a la clínica puesto que la investigación preclínica estaría ya cubierta y sus efectos adversos, después de más de 10 años en el mercado, son escasos incluso en tratamientos prolongados.

Bibliografía

1. Schulz JB, Weller M, Matthews RT, Heneka MT, Groscurth P, Martinou JC et al. Extended therapeutic window for caspase inhibition and synergy with MK-801 in the treatment of cerebral histotoxic hypoxia. (1998). *Cell Death Differ* **5**: 847-57.
2. Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF et al. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. (2003). *Nat Med* **9**: 1180-6.
3. Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. (2007). *Brain Res Rev* **54**: 34-66.
4. Malemud CJ. Inhibitors of stress-activated protein/mitogen-activated protein kinase pathways. (2007). *Curr Opin Pharmacol* **7**: 339-43.
5. Puerta E, Hervias I, Barros-Minones L, Jordan J, Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M et al. Sildenafil protects against 3-nitropropionic acid neurotoxicity through the modulation of calpain, CREB, and BDNF. (2010). *Neurobiol Dis* **38**: 237-45.
6. Orejana L, Barros-Minones L, Jordan J, Puerta E, Aguirre N. Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model. (2012). *Neurobiol Aging* **33**: 625 e11-20.
7. Puzzo D, Staniszewski A, Deng SX, Privitera L, Leznik E, Liu S et al. Phosphodiesterase 5 inhibition improves synaptic function, memory, and amyloid-beta load in an Alzheimer's disease mouse model. (2009). *J Neurosci* **29**: 8075-86.
8. Ding G, Jiang Q, Li L, Zhang L, Zhang ZG, Ledbetter KA et al. Magnetic resonance imaging investigation of axonal remodeling and angiogenesis after embolic stroke in sildenafil-treated rats. (2008). *J Cereb Blood Flow Metab* **28**: 1440-8.
9. Li L, Jiang Q, Zhang L, Ding G, Gang Zhang Z, Li Q et al. Angiogenesis and improved cerebral blood flow in the ischemic boundary area detected by MRI after administration of sildenafil to rats with embolic stroke. (2007). *Brain Res* **1132**: 185-92.
10. Zhang L, Zhang RL, Wang Y, Zhang C, Zhang ZG, Meng H et al. Functional recovery in aged and young rats after embolic stroke: treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. (2005). *Stroke* **36**: 847-52.

11. Zhang R. Sildenafil (Viagra) Induces Neurogenesis and Promotes Functional Recovery After Stroke in Rats. (2002). *Stroke* **33**: 2675-80.
12. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. (2008). *FASEB J* **22**: 659-61.
13. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. (2003). *Nat Rev Neurosci* **4**: 399-415.
14. Oliver CN, Starke-Reed PE, Stadtman ER, Liu GJ, Carney JM, Floyd RA. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5144-7.
15. Saito A, Maier CM, Narasimhan P, Nishi T, Song YS, Yu F et al. Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. (2005). *Mol Neurobiol* **31**: 105-16.
16. Fernandez-Gomez FJ, Galindo MF, Gomez-Lazaro M, Yuste VJ, Comella JX, Aguirre N et al. Malonate induces cell death via mitochondrial potential collapse and delayed swelling through an ROS-dependent pathway. (2005). *Br J Pharmacol* **144**: 528-37.
17. Maragos WF, Silverstein FS. Inhibition of nitric oxide synthase activity attenuates striatal malonate lesions in rats. (1995). *J Neurochem* **64**: 2362-5.
18. Bivalacqua TJ, Sussan TE, Gebaska MA, Strong TD, Berkowitz DE, Biswal S et al. Sildenafil inhibits superoxide formation and prevents endothelial dysfunction in a mouse model of secondhand smoke induced erectile dysfunction. (2009). *J Urol* **181**: 899-906.
19. Koupparis AJ, Jeremy JY, Muzaffar S, Persad R, Shukla N. Sildenafil inhibits the formation of superoxide and the expression of gp47 NAD[P]H oxidase induced by the thromboxane A2 mimetic, U46619, in corpus cavernosal smooth muscle cells. (2005). *BJU Int* **96**: 423-7.
20. Puerta E, Barros-Minones L, Hervias I, Gomez-Rodriguez V, Orejana L, Pizarro N et al. Long-lasting neuroprotective effect of sildenafil against 3,4-methylenedioxymethamphetamine- induced 5-hydroxytryptamine deficits in the rat brain. (2012). *J Neurosci Res* **90**: 518-28.

21. Muzaffar S, Shukla N, Srivastava A, Angelini GD, Jeremy JY. Sildenafil citrate and sildenafil nitrate (NCX 911) are potent inhibitors of superoxide formation and gp91phox expression in porcine pulmonary artery endothelial cells. (2005). *Br J Pharmacol* **146**: 109-17.
22. Puerta E, Hervias I, Goni-Allo B, Lasheras B, Jordan J, Aguirre N. Phosphodiesterase 5 inhibitors prevent 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced 5-HT deficits in the rat. (2009). *J Neurochem* **108**: 755-66.
23. Wang L, Gang Zhang Z, Lan Zhang R, Chopp M. Activation of the PI3-K/Akt pathway mediates cGMP enhanced-neurogenesis in the adult progenitor cells derived from the subventricular zone. (2005). *J Cereb Blood Flow Metab* **25**: 1150-8.
24. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. (2001). *Curr Opin Neurobiol* **11**: 297-305.
25. Bonny C, Borsello T, Zine A. Targeting the JNK pathway as a therapeutic protective strategy for nervous system diseases. (2005). *Rev Neurosci* **16**: 57-67.
26. Harper SJ, Wilkie N. MAPKs: new targets for neurodegeneration. (2003). *Expert Opin Ther Targets* **7**: 187-200.
27. Whitmarsh AJ, Yang SH, Su MS, Sharrocks AD, Davis RJ. Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. (1997). *Mol Cell Biol* **17**: 2360-71.
28. Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. (2008). *Pharmacol Rev* **60**: 261-310.
29. Yokota M, Saido TC, Tani E, Kawashima S, Suzuki K. Three distinct phases of fodrin proteolysis induced in postischemic hippocampus. Involvement of calpain and unidentified protease. (1995). *Stroke* **26**: 1901-7.
30. Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. (2000). *Nature* **405**: 360-4.
31. Kusakawa G, Saito T, Onuki R, Ishiguro K, Kishimoto T, Hisanaga S. Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. (2000). *J Biol Chem* **275**: 17166-72.

32. Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. (1999). *Nature* **402**: 615-22.
33. Hisanaga S, Saito T. The regulation of cyclin-dependent kinase 5 activity through the metabolism of p35 or p39 Cdk5 activator. (2003). *Neurosignals* **12**: 221-9.
34. Nath R, Davis M, Probert AW, Kupina NC, Ren X, Schielke GP et al. Processing of cdk5 activator p35 to its truncated form (p25) by calpain in acutely injured neuronal cells. (2000). *Biochem Biophys Res Commun* **274**: 16-21.
35. Rashidian J, Rousseaux MW, Venderova K, Qu D, Callaghan SM, Phillips M et al. Essential role of cytoplasmic cdk5 and Prx2 in multiple ischemic injury models, in vivo. (2009). *J Neurosci* **29**: 12497-505.
36. Slevin M, Krupinski J. Cyclin-dependent kinase-5 targeting for ischaemic stroke. (2009). *Curr Opin Pharmacol* **9**: 119-24.
37. Wang J, Liu S, Fu Y, Wang JH, Lu Y. Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. (2003). *Nat Neurosci* **6**: 1039-47.
38. Tang X, Wang X, Gong X, Tong M, Park D, Xia Z et al. Cyclin-dependent kinase 5 mediates neurotoxin-induced degradation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. (2005). *J Neurosci* **25**: 4823-34.
39. Gong X, Tang X, Wiedmann M, Wang X, Peng J, Zheng D et al. Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis. (2003). *Neuron* **38**: 33-46.
40. Verdaguer E, Alvira D, Jimenez A, Rimbau V, Camins A, Pallas M. Inhibition of the cdk5/MEF2 pathway is involved in the antiapoptotic properties of calpain inhibitors in cerebellar neurons. (2005). *Br J Pharmacol* **145**: 1103-11.
41. Okamoto S, Li Z, Ju C, Scholzke MN, Mathews E, Cui J et al. Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3974-9.
42. Li BS, Sun MK, Zhang L, Takahashi S, Ma W, Vinade L et al. Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12742-7.

43. Choi WS, Lee EH, Chung CW, Jung YK, Jin BK, Kim SU et al. Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. (2001). *J Neurochem* **77**: 1531-41.
44. Wood DE, Newcomb EW. Cleavage of Bax enhances its cell death function. (2000). *Exp Cell Res* **256**: 375-82.
45. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. (2000). *Cell Death Differ* **7**: 1166-73.
46. Camins A, Verdaguer E, Folch J, Canudas AM, Pallas M. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. (2006). *Drug News Perspect* **19**: 453-60.
47. Crespo-Biel N, Camins A, Pelegri C, Vilaplana J, Pallas M, Canudas AM. 3-Nitropropionic acid activates calpain/cdk5 pathway in rat striatum. (2007). *Neurosci Lett* **421**: 77-81.
48. Cheung ZH, Gong K, Ip NY. Cyclin-dependent kinase 5 supports neuronal survival through phosphorylation of Bcl-2. (2008). *J Neurosci* **28**: 4872-7.
49. Wang CX, Song JH, Song DK, Yong VW, Shuaib A, Hao C. Cyclin-dependent kinase-5 prevents neuronal apoptosis through ERK-mediated upregulation of Bcl-2. (2006). *Cell Death Differ* **13**: 1203-12.
50. Kim BJ, Ryu SW, Song BJ. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. (2006). *J Biol Chem* **281**: 21256-65.
51. De Chiara G, Marcocci ME, Torcia M, Lucibello M, Rosini P, Bonini P et al. Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: identification of target sites and biologic consequences. (2006). *J Biol Chem* **281**: 21353-61.
52. Gomez-Lazaro M, Galindo MF, Melero-Fernandez de Mera RM, Fernandez-Gomez FJ, Concannon CG, Segura MF et al. Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activate Bax to induce mitochondrial cytochrome c release and apoptosis in response to malonate. (2007). *Mol Pharmacol* **71**: 736-43.
53. Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. (2008). *Autophagy* **4**: 600-6.

54. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. (2008). *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 231-41.
55. Gibson ME, Han BH, Choi J, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Parsadanian M et al. BAX contributes to apoptotic-like death following neonatal hypoxia-ischemia: evidence for distinct apoptosis pathways. (2001). *Mol Med* **7**: 644-55.
56. Toulmond S, Tang K, Bureau Y, Ashdown H, Degen S, O'Donnell R et al. Neuroprotective effects of M826, a reversible caspase-3 inhibitor, in the rat malonate model of Huntington's disease. (2004). *Br J Pharmacol* **141**: 689-97.
57. Andreassen OA, Ferrante RJ, Hughes DB, Klivenyi P, Dedeoglu A, Ona VO et al. Malonate and 3-Nitropropionic Acid Neurotoxicity Are Reduced in Transgenic Mice Expressing a Caspase-1 Dominant-Negative Mutant. (2000). *Journal of Neurochemistry* **75**: 847 -52.
58. Menniti FS, Ren J, Coskran TM, Liu J, Morton D, Sietsma DK et al. Phosphodiesterase 5A inhibitors improve functional recovery after stroke in rats: optimized dosing regimen with implications for mechanism. (2009). *J Pharmacol Exp Ther* **331**: 842-50.
59. Bednar MM. The role of sildenafil in the treatment of stroke. (2008). *Curr Opin Investig Drugs* **9**: 754-9.
60. Gribkoff VK, Starrett JE, Jr., Dworetzky SI, Hewawasam P, Boissard CG, Cook DA et al. Targeting acute ischemic stroke with a calcium-sensitive opener of maxi-K potassium channels. (2001). *Nat Med* **7**: 471-7.
61. Wang X, Fisher PW, Xi L, Kukreja RC. Essential role of mitochondrial Ca²⁺-activated and ATP-sensitive K⁺ channels in sildenafil-induced late cardioprotection. (2008). *J Mol Cell Cardiol* **44**: 105-13.
62. Chi S, Cai W, Liu P, Zhang Z, Chen X, Gao L et al. Baifuzi reduces transient ischemic brain damage through an interaction with the STREX domain of BKCa channels. (2010). *Cell Death Dis* **1**: e13.
63. MacKinnon R. Potassium channels. (2003). *FEBS Lett* **555**: 62-5.
64. Isaacson JS, Murphy GJ. Glutamate-mediated extrasynaptic inhibition: direct coupling of NMDA receptors to Ca²⁺-activated K⁺ channels. (2001). *Neuron* **31**: 1027-34.

65. Schoppa NE, Westbrook GL. NMDA receptors turn to another channel for inhibition. (2001). *Neuron* **31**: 877-9.

66. Das S, Wong R, Rajapakse N, Murphy E, Steenbergen C. Glycogen synthase kinase 3 inhibition slows mitochondrial adenine nucleotide transport and regulates voltage-dependent anion channel phosphorylation. (2008). *Circ Res* **103**: 983-91.

Capítulo VI

Capítulo 6

Conclusiones

*Siempre llegarás a alguna parte,
si caminas lo suficiente.*

Lewis Carroll

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

1. El sildenafil, inhibidor selectivo de la PDE5, reduce de forma significativa la muerte neuronal producida la toxina mitocondrial malonato. Este efecto parece ser independiente de cualquier modificación en la producción de especies reactivas de oxígeno. Los resultados obtenidos, por el contrario, indican que la inhibición de las vías calpaína/p25/cdk5 y ASK-1/MKK3/6/p38, activadas tras la administración de malonato, juega un papel clave en el efecto neuroprotector de este PDE5i.

2. El sildenafil, además, aumenta la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL, así como la fosforilación del factor de supervivencia MEF-2, efectos que podrían participar de forma concomitante en la prevención de la muerte neuronal ocasionada por el malonato.

3. El efecto neuroprotector del sildenafil no es sólo preventivo si no también terapéutico ya que, por un lado, protege las células hipocampales sometidas a privación de oxígeno y glucosa cuando es administrado durante la reoxigenación y, además, disminuye la lesión tisular ocasionada por el malonato si se administra hasta 3 horas después del mismo.

Chapter 6

Conclusions

1. The phosphodiesterase 5 inhibitor, sildenafil, significantly decreases the neuronal death induced by the mitochondrial toxin malonate. This protective effect cannot be attributed to any effect on reactive oxygen species production. By contrast, our results suggest that inhibition of malonate-induced activation of calpain/p25/cdk5 and ASK-1/MKK3/6/p38 pathways play a key role in the neuroprotective effects of this PDE5i.

2. Sildenafil also increases the expression of two antiapoptotic proteins, namely Bcl-2 and Bcl-xL, as well as the phosphorylation of the prosurvival factor MEF2; effects that might, as well, contribute to prevent the cell death caused by malonate.

3. The neuroprotective effect of sildenafil is not only preventive but also therapeutic. Thus, sildenafil protects hippocampal slices subjected to oxygen and glucose deprivation (OGD) when administered during reoxygenation and also reduces tissue damage caused by malonate if administered up to 3 hours after the injection of the mitochondrial toxin.