**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**
Dottorato di Ricerca in "Scienze Biomediche Applicate"
(XXIII Ciclo)

**ORAZIO DANIELE ALABISO**

# EFFETTI DEGLI INIBITORI DELLE FOSFODIESTERASI 5 NEI MODELLI ANIMALI DI MALATTIA DI ALZHEIMER

**TESI DI DOTTORATO**

**Relatore:** *Chiar.mo Prof. A. Palmeri*

A.A. 2010-2011

# Indice generale

Introduzione....4
Cap. 1 - Ruolo dell'ossido nitrico nei fenomeni di apprendimento e memoria....7
1.1 Ossido nitrico: dal cuore al cervello....7
1.2 NO come messaggero retrogrado....8
1.3 Caratteristiche biochimiche, sintesi e meccanismo d'azione....10
1.4 Ruolo dell'NO nell'LTP e nella memoria....14
Cap. 2 - Malattia di Alzheimer e peptide beta-amiloide....19
2.1 Il peptide beta-amiloide....19
2.2 Clivaggio dell'APP....21
2.3 Le varie forme di Aβ....22
2.4 La Malattia di Alzheimer....24
2.4.1 Definizione ed epidemiologia....24
2.4.2 Eziopatogenesi....24
2.4.3 Reperti anatomo-patologici....27
2.5 Ruolo dell'Aβ nella Malattia di Alzheimer....28
2.5.1 Effetto dell'Aβ sui fenomeni di plasticità sinaptica....30
Cap. 3 - Utilizzo degli inibitori delle Fosfodiesterasi 5 in modelli animali di Malattia di Alzheimer....33
3.1 NO: funzione neuroprotettiva o neurotossica?....33
3.2 Il sistema NO/GMPc è coinvolto nella disfunzione sinaptica indotta dall'Aβ....37
3.3 Effetti delle fosfodiesterasi 5 sulla plasticità sinaptica e sulla memoria in modelli animali di Malattia di Alzheimer....38
3.3.1 Introduzione....38
3.3.2 Materiali e metodi....40
3.3.3 Risultati....48
3.3.4 Discussione....65
Bibliografia....71
Ringraziamenti....82

## *Introduzione*

*Noi siamo il nostro passato ed esso non può essere recuperato con altro sistema se non attraverso il meccanismo della memoria.*

***Henri Bergson***

La memoria permette di riprodurre l'esperienza passata e renderla nuovamente attuale pur nella lontananza spaziale e temporale dell'evento evocato. L'intera azione della memoria ha alla propria base il ricordo. Di esso ognuno ha una propria percezione ed esperienza, così, come in un moto automatico, migliaia di ricordi affiorano nella nostra memoria, alcuni temporalmente più lontani, appaiono sfocati ed imprecisi, dai contorni indefiniti, cosicché risulta difficile mettere a fuoco le diverse situazioni ad essi sottese. Altri invece si presentano chiari e definiti, consentendoci di ricordare eventi più o meno importanti o piacevoli. La memoria diventa così il mezzo privilegiato per poter effettuare un recupero fiducioso di fatti e di circostanze utili a chiarire le radici socio culturali di ognuno, la base fondamentale per la ricerca delle proprie origini e quindi della propria identità.

Alla base della memoria vi è il fenomeno dell'apprendimento, definito da alcuni studiosi come un processo che si manifesta attraverso cambiamenti adattativi del comportamento individuale in seguito all'esperienza.

L'importanza di capire i meccanismi che stanno alla base del processo della memoria, e la speranza di poter intervenire quando questi sono danneggiati, è pertanto facilmente intuibile: da essi dipendono la qualità della vita e la sopravvivenza stessa dell'individuo. Questo tipo di considerazioni contribuisce a rendere particolarmente attivo il campo della ricerca sui meccanismi sottesi alla memoria. Ci si domanda quanto gli studi sull'animale da laboratorio siano predittivi della realtà umana sia in termini di neurobiologia della memoria (si pensi ad esempio al differente e più esteso sviluppo della corteccia nell'uomo), sia riguardo l'effetto di farmaci di potenziale impiego terapeutico nei disturbi della memoria.

A maggior ragione viene ad essere negata la validità di esperimenti su modelli lontani dall'uomo come insetti o gasteropodi che conserverebbero una ragione d'essere soltanto nell'ambito della biologia o dell'etologia animale. Alcuni tipi di memoria, comunque, hanno caratteristiche comuni nell'animale e nell'uomo, e in questi possono essere studiate forme di apprendimento e memoria elementari (ad esempio il riflesso di ammiccamento condizionato) del tutto simili a quelle studiate in piccoli mammiferi. Indagini di questo tipo potranno risolvere questi dubbi e fornire quegli strumenti interpretativi che permetteranno di superare le barriere costituite dai diversi modelli e dalla lontananza di specie, di sfruttare pienamente e correttamente la mole di informazioni offerta dalla neurobiologia e di saper cogliere ed apprezzare, anche nei modelli animali,

quelle informazioni utili a comprendere tratti fondamentali degli eventi biologici complessi.

Come sarà illustrato in seguito, gran parte della ricerca si basa sulla sperimentazione condotta su animali. Ciò pone lo scienziato di fronte al problema etico, poiché ogni qual volta vengono utilizzate specie animali per scopi scientifici, bisogna assicurarsi che il fine ultimo sia "giusto" e che le metodiche utilizzate siano corrette e rispettose.

Ma il problema morale è molto complesso e tentare di risolverlo, probabilmente, non spetta allo scienziato: dal punto di vista scientifico vengono valutati i benefici che la ricerca su modelli animali ha dato, consentendo di salvare migliaia di vite umane.

# *Cap. 1 - Ruolo dell'ossido nitrico nei fenomeni di apprendimento e memoria*

## *1.1 Ossido nitrico: dal cuore al cervello*

L'ossido nitrico (NO) è un neurotrasmettitore di natura gassosa, costituito da un atomo di azoto e da un atomo di ossigeno, in grado di attraversare le membrane cellulari per diffusione. L'NO è sintetizzato nel citosol per mezzo dell'enzima NO sintasi (NOS).

Grazie alla sua scoperta, le conoscenze sulla comunicazione sinaptica nel sistema nervoso hanno subito una vera e propria rivoluzione (Bredt e Snyder, 1992; Brenman e Bredt, 1996).

La funzione dell'NO era già nota nel 1800, quando fu riconosciuto l'effetto benefico della nitroglicerina nel trattamento dell'*angina pectoris*. Costantin Hering sintetizzò un preparato di questa molecola ad uso sublinguale vantandone l'utilità per una varietà di malattie vascolari (Hering, 1849). Nel 1867, un famoso medico inglese, T. Lauder Brunton, notò che il nitrito di amile, una sostanza già allora conosciuta per le sue proprietà vasodepressive, era in grado di attenuare il dolore anginoso entro 30-60 secondi (Brunton, 1867). Nel 1879, William Murrell, dopo aver stabilito che gli effetti della nitroglicerina erano gli stessi del nitrito di amile, diede inizio alla terapia antianginosa moderna somministrando, a pazienti anginosi, la

nitroglicerina per via sublinguale sia durante gli attacchi acuti sia come profilassi prima di uno sforzo fisico (Murrel, 1879). A questa sostanza si attribuì così un effetto vasodilatatore che si esplica sia a livello delle coronarie che di tutti i vasi dell'organismo. Solo dopo diverso tempo si capì, attraverso studi sperimentali, che l'azione della nitroglicerina era determinata dalla formazione dell'NO a partire dallo sdoppiamento della molecola di nitroglicerina e che l'NO era capace di promuovere la sintesi del GMPc, un secondo messaggero che agendo con altri enzimi intracellulari, attiva la reazione vascolare. Nel 1980 Furchgott e Zawadzk (Furchgott e Zawadzk, 1980) dimostrarono la presenza di una sostanza che mediava l'azione dell'acetilcolina sull'endotelio vascolare, determinando vasodilatazione. Chiamarono questa sostanza EDRF (fattore di rilasciamento di derivazione endoteliale). Successivamente Palmer identificò l'EDRF con l'NO, molecola che mediava indirettamente la vasodilatazione endotelio-dipendente indotta dall'acetilcolina.

Nel SNC, l'NO fu identificato per la prima volta nel 1988 come una molecola in grado di provocare un aumento dei livelli di GMPc in seguito all'attivazione dei recettori NMDA (Garthwaite et al., 1988, Garthwaite e Boulton, 1995).

### *1.2 NO come messaggero retrogrado*

Negli ultimi anni, le conoscenze sulla comunicazione sinaptica a livello dei neuroni del SNC hanno subito una vera e propria rivoluzione grazie alla

scoperta, accanto ai classici neurotrasmettitori, neuromodulatori e cotrasmettitori, di un nuovo neuromodulatore, l'NO. La trasmissione nitrinergica costituisce una nuova e particolare forma di neurotrasmissione con caratteristiche peculiari che la differenziano da quella classica in quanto l'NO, essendo una molecola gassosa liberamente permeabile alle membrane biologiche, ha la capacità di diffondere in tempi molto rapidi da un neurone all'altro e dai neuroni alle cellule, ma soprattutto, non segue le classiche vie della comunicazione sinaptica chimica. Infatti, l'NO non viene immagazzinato nelle vescicole sinaptiche, ma prodotto nuovamente dopo la sua utilizzazione funzionale. Inoltre, la liberazione di NO non si verifica necessariamente ed esclusivamente nel terminale sinaptico, ma anche nel corpo del neurone e nei dentriti da cui può diffondere liberamente. È proprio la capacità dell'NO di fungere da messaggero retrogrado, trasferendo l'informazione dal neurone post-sinaptico al pre-sinaptico, ad aver aperto una nuova dimensione nel concetto classico di comunicazione neuronale. Se nella comunicazione chimica classica l'informazione, tramite il neurotrasmettitore viaggiava unidirezionalmente dalla fibra pre- alla post-sinaptica in uno spazio ristretto, quale la fenditura sinaptica, interagendo direttamente con il proprio recettore, l'NO, in base alle sue proprietà fisico-chimiche, diffonde e regola direttamente sia la sintesi (a livello pre-sinaptico) che l'attività del neurotrasmettitore (a livello post-sinaptico). L'NO dal suo sito di sintesi si diffonde per gradiente di concentrazione e va a combinarsi con il suo recettore biologico, la guanilato ciclasi solubile

(GCs), innescando una serie di reazioni a catena che verranno discusse in seguito. La diffusione dell'NO a distanza, la capacità di influenzare i meccanismi di trasmissione nervosa in senso retrogrado, la differente distribuzione dei suoi recettori e la conseguente influenza su diversi tipi di cellule, offre nuove prospettive sulle tipologie di integrazione e interazione a più livelli spaziali e temporali.

### *1.3 Caratteristiche biochimiche, sintesi e meccanismo d'azione*

L'NO è una molecola gassosa liposolubile estremamente semplice, costituita da un atomo di azoto ed uno di ossigeno, capace di attraversare le membrane cellulari per diffusione. In condizioni fisiologiche ha un'emivita molto breve, pochi secondi (circa 4-5) ed è altamente reattivo e instabile. Si libera per la conversione dell'aminoacido L-arginina in L-citrullina (Alderton et al., 2001; Giuffrida Stella, 2000). L'enzima che catalizza la formazione di NO è l'NO sintasi (NOS), proteina appartenente alla famiglia del citocromo P-450, che contiene nella sua struttura molecolare il gruppo prostetico eme. Esistono diverse isoforme di NOS: le isoforme costitutive calcio-dipendenti (c-NOS), distinte in forma endoteliale (e-NOS) o tipo III e la forma neuronale (n-NOS) o tipo I, presenti in cellule endoteliali, neuronali, e neurogliari, che producono NO in condizioni fisiologiche; e l'isoforma inducible calcio-indipendente (i-NOS) o tipo II, presente in macrofagi, epatociti, muscolo liscio ed endotelio che catalizza la produzione di NO in risposta a stimoli immunologici quali interferone γ (IFN-γ), fattore di

necrosi tumorale α (TNF-α) e lipopolisaccaride della parete cellulare batterica (LPS).

Tutte le forme di NOS richiedono dei cofattori come il FAD, l'FMN, l'eme, il $BH_4$ e la $Ca^{2+}$-calmodulina. Gli elettroni sono donati dal NADPH alla reduttasi dell'enzima e procedono tramite i carriers reduttivi di FAD ed FMN al dominio dell'ossigenasi. Qui possono interagire con l'eme, il ferro o il $BH_4$ nel sito attivo per catalizzare la reazione dell'ossigeno con l'L-Arginina, generando citrullina ed NO.

La presenza di NOS nel CNS fu confermata nel 1988 (Knowles et al., 1989) e l'enzima venne poi purificato e il cDNA clonato e sequenziato (Bredt et al., 1991; Bredt e Snyder, 1990). Vista la distribuzione ubiquitaria dell'NOS nel CNS si potrebbe dire che l'NO sia coinvolto praticamente in tutti i processi di trasmissione neuronale (Garthwaite e Boulton, 1995). La produzione di NO neuronale in risposta a stimoli eccitatori richiede Calcio (Garthwaite et al., 1988) e l'intervento della Calmodulina $Ca^{2+}$-dipendente (Bredt e Snyder, 1990; Knowles et al., 1989). La formazione neuronale di NO può avvenire in seguito a due tipi di stimoli fisiologici: la stimolazione post-sinaptica o il potenziale d'azione nella cellula presinaptica che portano all'influsso di $Ca^{2+}$ (Garthwaite e Boulton, 1995). Diversi fattori possono regolare la produzione di NO costituzionale, e quindi l'espressione dell'nNOS: neurotrasmettitori e neuromodulatori quali, bradichinina, endotelina, acetilcolina, endotelina, noradrenalina (Drummond, 1983;

Reiser, 1990a, 1990b), stress (Calzal et al., 1993), allattamento (Ceccatelli e Erickson, 1993), farmaci (Bagetta et al., 1993), ciclo luce-buio (Schaad et al., 1994).

Le cellule gliali producono NO grazie all'iNOS che può agire sia in modo $Ca^{2+}$-dipendente, quindi con meccanismo simile alla cNOS, in risposta a stimoli quali bradichinina, noradrenalina o agonisti del recettore metabotropico al glutammato (Agullo e Garcia, 1992; Murphy et al., 1990) o in maniera $Ca^{2+}$-indipendente, quando le cellule sono eposte a citochine o al liposaccaride batterico (Boje e Arora, 1992; Calzal et al., 1993). Quest'ultima modalità è presente in diversi tipi cellulari periferici quali macrofagi, neutrofili, cellule muscolari lisce, epatociti in cui l'NO generato da questa isoforma partecipa al meccanismo immunologico di difesa contro gli agenti patogeni (Garthwaite e Boulton, 1995).

Concludendo, tutte le forme di NOS richiedono, per la loro attività, un legame con la calmodulina, ma l'iNOS ha un'affinità così elevata per la calmodulina da manifestare la sua attività enzimatica anche in presenza di bassi livelli di calcio. Mentre eNOS ed nNOS provocano piccole variazioni di NO in risposta a transitori aumenti di calcio intracellulare, la forma iNOS provoca una continua produzione di NO finché il substrato è presente, e pertanto può essere definita calcio-indipendente. Queste osservazioni inducono a ritenere che sia proprio la iNOS a causare una produzione talmente abbondante di NO da determinare un danno tissutale in diverse condizioni patologiche.

Alla produzione di NO segue l'attivazione della GCs, enzima ubiquitario nel CNS, relativamente abbondante nel nucleo striato, nella sostanza nigra, nella corteccia cerebrale, nel cervelletto, nel bulbo olfattivo e in altre zone del tronco encefalico, e presente sia nelle cellule muscolari lisce dei vasi sanguigni che in altri tessuti periferici. L'attivazione della GCc causa un aumento della concentrazione intracellulare di GMPc a partire dal guanin-trifosfato (GTP).

La GCc è un eterodimero costituito da una subunità α e una subunità β di circa 80 e 70 kDa, rispettivamente, entrambe richieste per l'attività enzimatica. Il sito per l'NO è associato all'eme cui l'NO si lega con alta affinità. Ogni subunità può avere diverse isoforme (Garbers, 1992) che sono variamente distribuite nel CNS. Vista la distribuzione ubiquitaria dell'mRNA per la subunità β1, potrebbe darsi che è questa subunità a combinarsi con diverse subunità α in base alla regione cerebrale interessata.

Una volta formatosi, il GMPc può subire un diverso destino. Un meccanismo d'azione potrebbe coinvolgere i canali GMPc-dipendenti, presenti, ad esempio, nei fotorecettori retinici, nelle cellule olfattive, nel cervelletto e in diversi tessuti periferici quali aorta, cuore e reni (Garthwaite e Boulton, 1995). Un altro target è rappresentato dale protein-chinasi G (PKG) localizzate a livello dei vasi e del SNC (Francis et al., 1994). Le PKG fanno parte di una famiglia di proteine con un ruolo importante come trasduttori del segnale (Lohmann et al., 1997): la PKGI, composta da due subunità α e β, ampiamente distribuita, e l a PKGII, monomero attivato in

modo selettivo dal GMPc ed espresso in diversi tessuti quali cervello, polmone, rene e testicolo. Il GMPc agisce anche su un'altra famiglia di enzimi, le fosfodiesterasi (PDEs) tramite cui regola i suoi livelli e quelli dell'AMPc.

### *1.4 Ruolo dell'NO nell'LTP e nella memoria*

I meccanismi intrinseci che stanno alla base delle modificazioni plastiche non sono del tutto conosciuti anche se diversi studi vedono il coinvolgimento dell'NO in vari fenomeni di plasticità quali la riorganizzazione della corteccia in seguito a deprivazione dell'input sensoriale periferico (Ma et al., 1999). I meccanismi di plasticità più studiati sono sicuramente quelli inerenti i meccanismi cellulari alla base dei fenomeni di apprendimento e memoria. Questi, come già detto nel Cap. 2, consistono in modificazioni a lungo termine dell'efficacia sinaptica attività-dipendenti e si verificano nelle diverse strutture cerebrali considerate possibili siti di formazione e deposito della memoria (ippocampo, corteccia e cervelletto). La forma di plasticità sinaptica più studiata è l'LTP che si verifica a livello ippocampale.

Durante gli ultimi anni, un quesito fondamentale ha proprio riguardato lo stabilire le componenti pre- e post-sinaptiche dell'LTP. Si sapeva che l'LTP coinvolgeva l'attivazione dei recettori glutamatergici post-sinaptici NMDA e che a ciò conseguiva un aumeno del flusso di calcio; ma si sapeva anche che il mantenimento del fenomeno coinvolgeva il terminale pre-sinaptico

con una maggiore liberazione di glutammato (Bliss et al., 1986; Bonhoeffer et al., 1989). Quindi l'LTP aveva entrambe le componenti pre- e post-sinaptica. Ma come faceva l'informazione a passare dal terminale post- a quello pre-sinaptico? Nel 1991, O'Dell et al., suggerirono che l'induzione dell-LTP coinvolgesse la produzione e il rilascio dai dendriti post-sinaptici di un messaggero retrogrado che potesse agire a livello pre-sinaptico (O'Dell et al., 1991). Studiando il fenomeno su cellule ippocampali di cavia, identificarono questo messaggero come l'NO. Infatti, non solo inibitori dell-NOS quali la NG-Nitro-L-arginina bloccavano l-LTP, ma questa inibizione era parzialmente corretta somministrando il precursore dell'NO, l'L-arginina. Inoltre, l'NO era in grado di determinare un aumento del rilascio presinaptico spontaneo del trasmettitore da neuroni ippocampali su culture cellulari (O'Dell et al., 1991). Altri studi hanno focalizzato l'attenzione sul coinvolgimento dell'NO nell'LTP con risultati non sempre univoci. È stato dimostrato che l'uso di inibitori della NOS o dell'NO scavenger emoglobina, anche se con diversi risultati in base alle concentrazioni e ai tempi di applicazione, determinava un'inibizione dell'LTP (Bohme et al., 1991; Bon et al., 1992; Lum-Ragan e Gribkoff, 1993; Haley et al., 1992; O'Dell et al., 1991; Schuman e Madison, 1991). L'LTP è inoltre bloccata in modelli di topi knock-out per nNOS ed e-NOS (Son et al., 1996). Risultati contrastanti si sono avuti anche in merito alle fasi dell'LTP che venivano bloccate, con studi che riferivano un blocco sia a breve- che a lungo-termine (Arancio et al., 1995; Haass et al., 1992) o solo a breve termine

(Bohme et al., 1991; O'Dell et al., 1991). Anche l'entità dello stimolo che determina l'LTP è stata chiamata in causa, visto che molti studi hanno dimostrato che l'NO è coinvolto nel fenomeno solo quando l'LTP è indotta da stimoli deboli (Chetkovich et al., 1993; Gribkoff e Lum-Ragan, 1992; Haley et al., 1993). Ulteriori variabili che spesso hanno dato risultati contrastanti sono l'età degli animali usati e la temperatura (Bohme et al., 1991; Haley et al., 1992; O'Dell et al., 1991; Schuman e Madison, 1991; Williams et al., 1993). Altre prove a favore del coinvolgimento dell'NO sono date da esperimenti che dimostrano che l'applicazione esogena di NO può indurre LTP, mentre altri studi hanno visto che la perfusione con donatori di NO deprime la trasmissione sinaptica in CA1 (Arancio et al., 1996; Bon e Garthwaite, 2001; Zhuo et al., 1993) in relazione alle condizioni sperimentali usate e ad alcune variabili come la concentrazione e il tempo d'applicazione (Izumi e Zorumski, 1993; Reyes-Harde et al., 1999). Quindi, l'NO agisce sia nel terminale pre-sinaptico come messaggero retrogrado nell'E-LTP che nel terminale post-sinaptico nell'LTP con conseguente fosforilazione di CREB, sintesi di mRNA e di proteine (Bonhoeffer et al., 1989; Gudi et al., 1996; Lu et al., 1999; Ohki et al., 1995; Schuman e Madison, 1991).

Si è anche studiato la cascata a valle, vedendo che è il GMPc a mediare gli effetti dell'LTP NO-dipendente (Haley et al., 1993; Zhuo et al., 1994). Analoghi del GMPc inducono l'LTP anche in presenza di APV, antagonista dei recettori NMDA, o di L-NAME, un inibitore della NOS, suggerendo che

il GMPc può bypassare gli eventi post-sinaptici che portano all'induzione dell'LTP. Anche iniezioni intracellulari di GMPc nel neurone presinaptico in presenza di APV inducono l'LTP in culture ippocampali (Arancio et al., 1995).

Anche studi comportamentali hanno mostrato che l'NO è coinvolto in alcuni tipi di apprendimento e memoria (Hawkins et al., 1996; Susswein et al., 2004) e uno degli obiettivi della ricerca è stato quello di associare le modificazioni della plasticità sinaptica con le modificazioni comportamentali indotte dalla cascata dell'NO. L'NO è coinvolto in alcuni tipi di memoria e apprendimento, come l'apprendimento spaziale. Bohme et al. (Bohme et al., 1993) hanno dimostrato che l'inibizione dell'NO endogeno usando un inibitore della NOS nei ratti danneggia l'apprendimento spaziale testato con la *radial arm maze* e la memoria olfattiva testate con il *social recognition test*. Gli inibitori della NOS bloccano anche l'LTP confermando il legame tra elettrofisiologia e comportamento (Bohme et al., 1993). Altri studi usando animali trattati con inibitori della NOS o effettuati su topi knockout mice per l'nNOS mostrano un danneggiamento dell'apprendimento spaziale nel test della Morris water maze (MWM), un compito che coinvolge la memoria di riferimento (Chapman et al., 1992; Kirchner et al., 2004; Koylu et al., 2005; Zou et al., 1998), la memoria di riconoscimento degli oggetti nei ratti (Prickaerts et al., 1997). D'altro canto, il danneggiamento in un altro test di memoria spaziale, la *Y-maze test*, causato dal blocco dei recettori NMDA, può essere

ripristinato usando donatori di NO, L-Arginina o analoghi del GMPc (Yamada et al., 1996). Sembra inoltre che i fenomeni di apprendimento inducano un'*up-regulation* della NOS nel cervello del ratto (Zhang et al., 1998). Altri studi, al contrario, hanno dimostrato che l'inibizione dell'NO non danneggia l'apprendimento spaziale (Bannerman et al., 1994; Blockland et al., 1999). L'NO sembra anche essere convolto nella memoria a lungo termine, ma in relazione alla fase di training studiata. In alcuni esperimenti la memoria a lungo termine veniva danneggiata solo se l'inibizione dell'NO si verificava durante la fase di training (Katzoff et al., 2002; Robertson et al., 1996; Teyke, 1996), in altri studi dopo il *training* (Baratti e Boccia, 1999), in altri ancora prima del training (Fin et al., 1995). Comunque, molti studi hanno riportato che l'azione dell'NO sul comportamento è mediata dal sistema GCs/GMPc/PKG poiché l'aumento dei livelli di GMPc nell'ippocampo o la somministrazione di analoghi del GMPC come l'8-Br-cGMP (Bernabeu et al., 1996), o lo zaprinast, un inibitore selettivo della PDE (Prickaerts et al., 1997), migliorano la memoria. Allo stesso modo, la memoria è bloccata in seguito all'inibizione della GCs o dell'attività della PKG.

# *Cap. 2 - Malattia di Alzheimer e peptide beta-amiloide*

## *2.1 Il peptide beta-amiloide*

La β-Amiloide (Aβ) è un peptide di 40 a 42-aminoacidi considerato il principale fattore patogenetico nel Morbo di Alzheimer (*Alzheimer's Disease*, AD). L'Aβ si forma ad opera di specifiche proteasi a partire da un precursore detto APP (amyloid precursor protein) (Haass et al., 1992). L'APP è una glicoproteina integrale tipo I transmembrana che possiede un largo dominio extracellulare e un piccolo dominio intracellulare (Fig. 2.1). Il gene dell'APP è localizzato sul cromosoma 21 (21q21.2-3). L'APP, a distribuzione pressoché ubiquitaria (neuroni, glia, endotelio, fibroblasti), sembra avere una funzione fisiologica importante soprattutto per quanto riguarda i fenomeni di neuroplasticità (Mattson, 1997). Infatti, l'espressione di una sua subunità (β-APP) aumenta nei processi di differenziazione e crescita neuronale (Salbaum e Ruddle, 1994), suggerendo un suo ruolo nello sviluppo del sistema nervoso, confermato tra l'altro da diversi studi comportamentali e sulla plasticità sinaptica (Qiu et al., 1995). L'APP potrebbe anche essere coinvolto in alcuni meccanismi mnemonici e nell'LTP (Huber et al., 1993; Ishida et al., 1997).

Dall'APP derivano diversi frammenti con funzioni sia fisiologiche che fisiopatologiche (Mattson, 1997). Ad esempio, il rilascio del frammento NH2 sembra essere coinvolto nei fenomeni elettrici di membrana (Nitsch et

al., 1993), mentre il frammento COOH e l'Aβ intervengono nei processi apoptotici e di morte neuronale (Loo et al., 1993), avendo un ruolo predominante in alcune patologie neurodegenerative quali l'AD (Selkoe, 2002). Alcune forme rare di AD familiare sarebbero correlate a mutazioni sia dell'APP che delle γ-secretasi (preseniline, PS) (Berezovska et al., 2005; Citron et al., 1992; Finckh et al., 2005; Renbaum e Levy-Lahad, 1998; Rossor et al., 1993; St George-Hyslop, 2000; Tanzi et al., 1996) e diversi modelli animali di AD manifestano un'iperespressione di β-APP e PS (per una review, vd. Spires e Hyman, 2005). La quasi totalità degli studi ha focalizzato l'attenzione sull'effetto citotossico dell'Aβ i cui meccanismi d'azione sarebbero molteplici: stress ossidativo, stimolazione dei meccanismi flogistici, alterazioni recettoriali, alterazioni dei canali del calcio e del potassio.

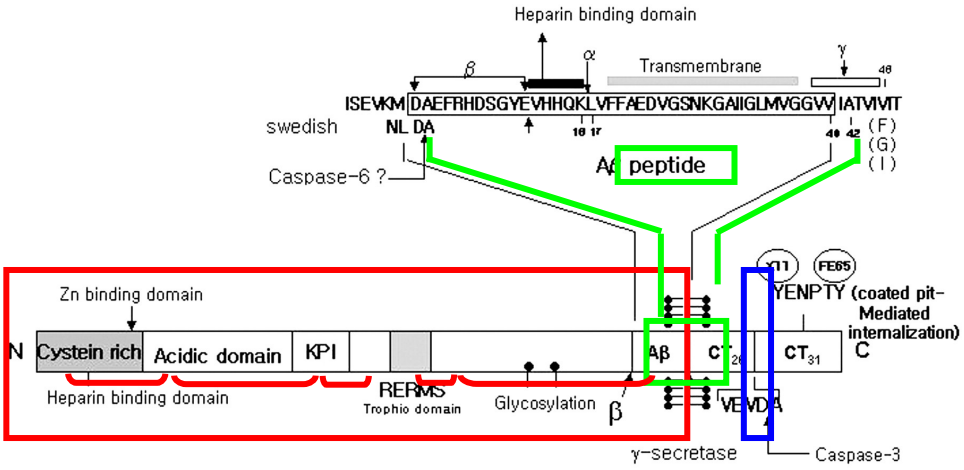


**Fig. 2.1 – Struttura dell'APP.** L'APP contiene un grande dominio extracellulare, un dominio idrofilico transmembrana e un corto dominio intracellulare COOH (rispettivamente indicati in rosse, verde e blu). In alto, la sequenza aminoacidica dell'Aβ e i siti di clivaggio per le α- β- e γ-secretasi. Le α- e β-secretasi agiscono a livello del dominio extracellulare; le γ-secretasi agiscono sul dominio transmembrana su due siti che portano alla formazione dell'Aβ-40 e -42, rispettivamente.

### *2.2 Clivaggio dell'APP*

L'APP è sensibile a fenomeni proteolitici di clivaggio tramite un complesso processamento che porta alla secrezione di frammenti più o meno grandi con funzioni caratteristiche. Partendo dall'NH2, si riconoscono due siti di clivaggio nella porzione extracellulare (detti α, β) ed un sito (γ) nel dominio transmembrana (Fig. 2.2)**.** Inizialmente l'APP sarà tagliato a livello dei siti α o β, dando origine a due grandi domini extracellulari solubili che differiscono solo per 17AA al COOH. Questi sono detti sAPPα ed sAPPβ, rispettivamente, e possiedono diverse funzioni.

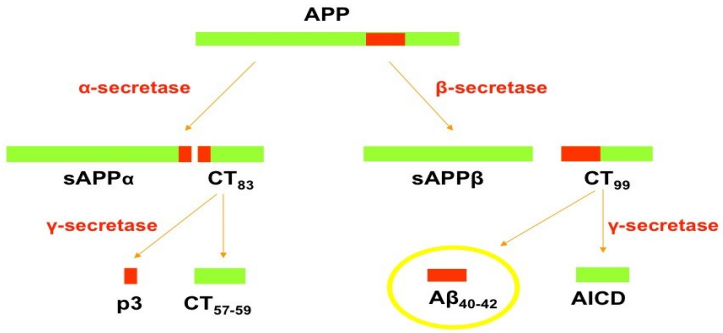


**Fig. 2. 2 – Clivaggio dell'APP e formazione dei vari frammenti**

La restante porzione dell'APP, detta CTF (frammento carbossi-terminale), conterrà 83AA (C83) se ha agito la α-secretasi o 99AA (C99) se il clivaggio è avvenuto ad opera delle β-secretasi. Il clivaggio transmembrana sarà poi catalizzato dalle γ-secretasi. Dal frammento C83 derivano un frammento

detto p3 e un frammento C-term di 57-59AA. Dal frammento C99 derivano l'Aβ40 o 42 e un frammento C-term detto AICD (APP intracellular domain). Quindi, l'Aβ potrà formarsi soltanto se hanno agito le β-proteasi.

## *2.3 Le varie forme di Aβ*

Da quando è stato scoperto che l'Aβ svolge un ruolo determinante nella patogenesi dell'AD, sono stati effettuati diversi studi per comprendere le caratteristiche chimiche e morfologiche del peptide. Sono state identificate diverse forme di Aβ, ognuna con funzioni e proprietà peculiari (Saido et al., 1995; He e Barrow, 1999; Russo et al., 2002). L'Aβ solubile, cioè quella appena prodotta dalle cellule o la frazione di Aβ tissutale o sintetica contenuta in un mezzo acquoso, è stata identificata nel 1994 da frazioni solubili prelevate dalla corteccia cerebrale di pazienti affetti da AD (Tabaton et al., 1994). Questa forma di Aβ sembra essere la prima forma di accumulo del peptide (Tabaton et al., 1994).

In relazione alla struttura, l'Aβ è distinta in "monomerica" ed "oligomerica", considerando la presenza di assemblati a bassa stechiometria quali i monomeri, i dimeri, e i trimeri, mentre le "protofibrille" rappresentano strutture di ordine intermedio tra gli aggregati menzionati e le fibrille presenti nelle caratteristiche placche senili (Gandy, 2005). Gli oligomeri solubili di Aβ sono stati isolati dal cervello, dal plasma, dal liquido cefalorachidiano (Kuo et al., 1996; Roher et al., 1996), da cellule transfettate (Podlisny et al., 2000), da cellule derivate dal cervello umano

(Walsh et al., 2000, 2002). Gli oligomeri e le protofibrille sembrano essere gli stati di assemblaggio con la maggiore tossicità, specialmente nei modelli di culture cellulari neuronali (Kayed et al., 2004; Klein et al., 2001). *In vitro*, l'Aβ oligomerica esercita una forte azione inibitoria sull'LTP (Puzzo et al., 2005; Selkoe, 2002; Vitolo et al., 2002; Walsh et al., 2000, 2002).

Il processo di aggregazione del peptide dipende da vari fattori, tra cui il tempo e la concentrazione. Per quanto riguarda il tempo, è interessante sottolineare l'esistenza di una cosiddetta *lag phase* in cui non c'è aggregazione (Fezoui e Teplow, 2002). Dopo questa fase l'aggregazione avviene molto rapidamente. Sono state trovate similitudini tra aggregazione dell'Aβ e delle proteine prioniche implicate nella Malattia di Creutzfeldt-Jacob e nell'encefalite spongiforme. Pare che in entrambi i casi sia fondamentale l'alterazione strutturale delle proteine dalla forma ad alfa elica alla forma beta-sheet (Pan et al., 1993).

Le principali forme di Aβ presenti nel sistema nervoso centrale sono l'Aβ1-40 e 1-42. L'Aβ1-42 è predominante nelle placche senili, probabilmente per la sua spiccata tendenza all'aggregazione (Cullen et al., 1997). Infatti, è proprio questa forma ad essere la reponsabile dell'iniziale formazione degli oligomeri, delle fibrille e quindi delle placche (Gandy, 2005; Younkin, 1995).

## *2.4 La Malattia di Alzheimer*

### 2.4.1 Definizione ed epidemiologia

La Malattia di Alzheimer (AD) si definisce come *malattia primaria dell'encefalo caratterizzata da demenza progressiva che si manifesta in età adulta o senile* (Pancheri e Cassano, 1999). La malattia fu descritta per la prima volta da Alois Alzheimer, nel 1907, come forma di demenza ad esordio presenile. Nell'accezione attuale, invece, l'AD comprende sia forme senili che presenili.

L'AD rappresenta una delle principali cause di malattia e di morte dell'età avanzata, è la forma più frequente di demenza nell'anziano e colpisce oggi 3 milioni di individui negli USA e 450.000 in Italia. Sia la prevalenza sia l'incidenza della malattia aumentano esponenzialmente con l'età, quindi la previsione è di un netto incremento della malattia in relazione all'aumento dell'aspettativa di vita.

### 2.4.2 Eziopatogenesi

L'eziologia rimane a tutt'oggi sconosciuta. I maggiori successi dello studio eziologico e patogenetico sono legati a tecniche di indagine di biologia molecolare concentrate sulla caratterizzazione delle proteine implicate nella patogenesi dell'AD e dei geni che le codificano. Si sono fatte diverse ipotesi, che necessitano pero' di ulteriori approfondimenti. L'*ipotesi*

*ereditaria* si basa sulla presenza di mutazioni per l'APP e le PS nei cromosomi 21 e 14 nei casi di AD ad insorgenza precoce (Familial Alzheimer Disease - FAD) e sulla presenza di una variante genetica del gene 19 per le ApoE4 presente nel 50% della popolazione affetta da Alzheimer (e nel 15% della popolazione sana). Tale variante è stata pertanto considerata un fattore genetico di rischio. Inoltre, pare che gli individui con una storia famigliare di AD presentino un decorso più rapido della malattia. Secondo l'*ipotesi immunitaria*, l'organismo produrrebbe auto-anticorpi per i neuroni colinergici. Sia l'*ipotesi virale*, che individua in un'infezione virale il primum movens della patologia, che l'*ipotesi dell'intossicazione* da metalli pesanti o da mutata permeabilità della barriera emato-encefalica che permetterebbe l'entrata di sostanze tossiche, non sono suffragate da sufficienti prove. Non è comunque escluso che due o più ipotesi possano combinarsi nel determinare la patologia.

Dall' analisi post-mortem di tessuti cerebrali di pazienti affetti da AD, si è potuta riscontrare la presenza di accumuli extracellulari di Aβ sotto forma di caratteristiche placche che innescano un processo infiammatorio coinvolgendo macrofagi e neutrofili con conseguente produzione di citochine, interleuchine e TNF-α con danno irreversibile di neuroni. A livello intracellulare si ha accumulo della proteina tau che, iperfosforilata, si accumula in aggregati neurofibrillari. I neuroni maggiormente colpiti sono quelli colinergici ippocampali.

Per diverso tempo si è discusso su quale potesse essere il *primum movens* della malattia tra l'accumulo di Aβ o di tau creando due campi distinti di studio, che sono rimasti separati per decenni, perché espressione di due teorie apparentemente inconciliabili: la prima attribuiva il ruolo causale ad una cascata di eventi originati dall'Aβ (Beta-Amyloid-Plaques o BAP, per cui i suoi sostenitori erano chiamati *BAP-tists*), la seconda alle alterazioni dovute alla iperfosforilazione della proteina *tau* (i sostenitori erano perciò detti *Tau-tists*).

Attualmente pare che la cascata amiloide sia collegata con l'alterazione neurofibrillare intracellulare. In particolare, gli aggregati di Aβ attiverebbero una successione di eventi che porterebbe le chinasi intracellulari a fosforilare in eccesso la proteina tau, con conseguente cambiamento delle sue proprietà chimiche ed avvio dello scompaginamento delle strutture neurofibrillari.

Nell'AD si verificano anche diverse alterazioni del metabolismo energetico e bioumorale. Il consumo di glucosio risulta ridotto e lo studio degli enzimi implicati nel metabolismo energetico dimostra che molti di essi sono alterati. In particolare, risultano ridotti gli enzimi della via glicolitica e sono presenti alterazioni a carico del metabolismo energetico dei carboidrati. Fra gli enzimi più compromessi figurano la piruvatochinasi che provoca una riduzione della sintesi di acetilcolina, essenziale per il corretto funzionamento dei processi cognitivi e mnesici, e la fosfofruttochinasi il cui deficit può ridurre la quantità di ATP a livelli inadeguati al fabbisogno

neuronale (Amaducci et al., 1990). Un decremento dell'attività della fosfofruttochinasi, dell'attività ossidativa del glucosio e della glutamina ed un aumento del contenuto cellulare in calcio (Peterson and Goldman, 1986) sono stati osservati anche in colture di fibroblasti di soggetti con AD.

Per ciò che concerne i neurotrasmettitori, l'acetilcolina e il glutammato sono senza dubbio coinvolti nei processi mnesici, e il deficit monoaminergico potrebbe svolgere un ruolo nel determinare i sintomi comportamentali e affettivi caratteristici della malattia, né va sottovalutata una possibile rilevanza del deficit serotoninergico per quanto riguarda la compromissione cognitiva.

### 2.4.3 Reperti anatomo-patologici

Nonostante l'AD sia caratterizzata da un dato anatomopatologico comune, cioè dalla presenza di depositi di Aβ, oggi si ritiene che la patologia abbia una base genetica eterogenea. Vari studi di *linkage* hanno permesso di identificare tre geni che, mutati, provocano demenza presenile, localizzati sui cromosomi 21, 14, ed 1 (Merette et al., 1993; Neumann et al., 1993; Macciardi e Cavallini, 1993).

L'osservazione neuroanatomica macroscopica classica dell'encefalo di un paziente con AD è un'atrofia diffusa del SNC. Nelle fasi iniziali del processo la perdita neuronale interessa alcune aree e strutture corticali e subcorticali: in particolare l'ippocampo, il carrefour tempor-parieto-

occipitale, i nuclei basali colinergici del proencefalo ed alcuni nuclei ipotalamici. I reperti neuropatologici patognomonici dell'AD sono le placche senili (Fig. 2.3), gli agglomerati neurofibrillari, la perdita neuronale, la perdita delle connessioni sinaptiche e la degenerazione granulovacuolare.

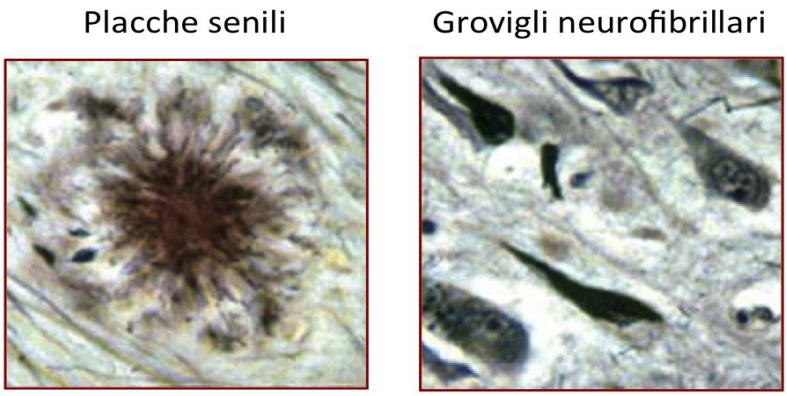


**Fig. 2.3 – Reperti anatomopatologi nei cervelli di pazienti con AD**

### *2.5 Ruolo dell'Aβ nella Malattia di Alzheimer*

Come precedentemente detto, l'AD è una patologia neurodegenerativa caratterizzata da deterioramento cognitivo con iniziale perdita di memoria che arriva fino al quadro conclamato di demenza. Negli stadi avanzati della patologia sono presenti atrofia cerebrale, depositi di Aβ sotto forma di placche senili e nel microcircolo cerebrale, e presenza di grovigli

neurofibrillari (Selkoe, 1994, 2002). Le lesioni patognomoniche sono rappresentate proprio dalle placche extracellulari, composte prevalentemente da Aβ42, e dalle neurofibrille intracellulari composte da microtubuli e dalla proteina tau iperfosforilata (Citron, 2004; Gandy et al., 2003; Selkoe e Schenk, 2003). Le placche sono distribuite essenzialmente nelle aree cerebrali deputate ai fenomeni cognitivi quali la memoria: ippocampo, corteccia entorinale, amigdala, lobi: frontale, temporale e parietale (Selkoe e Schenk, 2003). Si pensa che sia l'aumentata produzione, che la diminuita eliminazione dell'Aβ abbiano un ruolo fondamentale nell'iniziare la cascata di eventi che portano alla neurodegenerazione (Klein et al., 2001; Selkoe, 2002).

Diversi studi hanno cercato di capire se i depositi di Aβ riscontrati siano la causa o l'effetto della patologia. Certo è che la mutazione del gene APP è responsabile di alcune forme familiari di AD e che i depositi di Aβ siano un segno patognomonico dell'AD. D'altro canto esistono casi in cui il deficit cognitivo compare prima della formazione delle caratteristiche placche (Selkoe e Schenk, 2003). Probabilmente in questa fase le alterazioni sono date dalla presenza di Aβ oligomerica che gradualmente si aggrega portando poi alla formazione delle placche.

Studi recenti sul meccanismo di neurotossicità dell'Aβ suggeriscono che l'Aβ possa danneggiare le cellule sia direttamente, che rendendo queste più vulnerabili ad eventi esterni. Questa azione può essere esplicata con diversi meccanismi, quali la tossicità da glutammato e lo stress ossidavo che

alterano l'omeostasi del calcio (Mattson et al., 1993). L'Aβ rende inoltre le cellule nervose più suscettibili all'azione degli aminoacidi eccitatori, dello stress ossidativo e dell'ipoglicemia (Koh et al., 1990; Mattson et al., 1992). Anche questi effetti indiretti sembrano essere mediati da un aumento di calcio intracellulare (Mattson et al., 1992). L'Aβ potrebbe dunque distruggere l'omeostasi del calcio intracellulare deteriorando la funzione delle proteine che regolano gli ioni come i canali del potassio (Etcheberrigaray et al., 1993) e i trasportatori di ioni come la $Na^+$-$K^+$-ATPasi e la $Ca^{2+}$-ATPasi (Mark et al., 1995). È stato inoltre dimostrato che l'Aβ potrebbe formare dei canali per il $Ca^{2+}$ nel doppio strato lipidico della membrana cellulare (Arispe et al., 1993).

### 2.5.1 Effetto dell'Aβ sui fenomeni di plasticità sinaptica

Altri studi hanno focalizzato l'attenzione non già sulla neurodegenerazione, tappa finale della patologia, ma sulla precoce disfunzione sinaptica. Infatti, i sintomi amnestici precoci, che si verificano in assenza di altri segni clinici di danno cerebrale, sembrano essere dovuti a un effetto subdolo che l'Aβ esercita a livello sinaptico (Cullen et al., 1997; Itoh et al., 1999; Vitolo et al., 2002; Walsh et al., 2002). Bassi livelli di assemblati patologici di Aβ provocherebbero un'alterazione dei meccanismi responsabili della neurotrasmissione eccitatoria sinaptica producendo una disfunzione del meccanismo sinaptico che precede il danno strutturale con perdita delle sinapsi stesse (Selkoe, 2002). Inoltre, l'$A\beta_{1\text{-}42}$ inibisce l'LTP, che è alla base

dei fenomeni mnemonici ed è influenzata da diverse cascate di secondi messaggeri (Bliss e Collingridge, 1993). Quest'azione dell'Aβ sull'LTP è stata studiata a lungo e si è potuto appurare che sia l'Aβ sintetica che l'Aβ solubile derivata da colture cellulari umane inibiscono l'LTP ippocampale, sia in vitro che in vivo (Cullen et al., 1997; Vitolo et al., 2002; Puzzo et al., 2005; Walsh et al., 2002; Wang et al., 2004). Diversi studi hanno cercato di chiarire quali siano le cascate di secondi messaggeri tramite cui l'Aβ blocca l'LTP. Wang et al. (2004) hanno dimostrato che l'inibizione dell'LTP da Aβ coinvolge l'attivazione di alcune chinasi tra cui la c-Jun N-terminal kinasi (JNK), la p38 MAP kinasi (p38 MAPK), and cyclin-dependent kinasi 5 (Cdk5) ma anche il recettore metabotropico per il glutammato di tipo 5 (Wang et al., 2004). Studi su fette di ippocampo hanno dimostrato che l'Aβ1-42 attiva la cascata della proteina chinasi mitogen activated (MAPK) tramite i recettori α-7 nicotinici per l'acetilcolina (α-7nAChRs) (Dineley et al., 2001). Questi autori hanno inoltre dimostrato che in modelli animali di AD (Tg2576) (Dineley et al., 2001), l'aumento di Aβ *in vivo*, porta all'up-regulation degli α-7nAChR nell'ippocampo. Questa up-regulation degli α-7nAChR nei modelli Tg2576 è inoltre correlata ad un deterioramento delle loro performance nel test comportamentale della Morris water maze che indaga l'apprendimento spaziale ippocampo-dipendente. L'up-regulation degli α-7nAChR avviene in concomitanza dell'alterazione dell'isoforma 2 della chinasi regolata dal segnale cellulare (extracellular signal-regulated kinase - ERK2) MAPK (Dineley et al., 2001). Altri studi hanno dimostrato il

coinvolgimento del sistema AMPc/PKA/CREB (Vitolo et al., 2002; Gong et al., 2004) nel deterioramento dell'LTP indotto da Aβ. È stato infatti dimostrato che l' Aβ1–42, a concentrazioni molto inferiori rispetto a quelle che provocano morte cellulare, causa una diminuzione sostanziale dell'attività della PKA in culture di neuroni ippocampali e la rapida inibizione della fosforilazione di CREB in risposta alla stimolazione con glutammato. Il rolipram e la forskolina, sostanze che aumentano i livelli intracellulari di AMPc, ripristinano questi fenomeni probabilmente favorendo la dissociazione delle subunità regolatoria e catalitica della PKA con conseguente ripresa della sua attività (Vitolo et al., 2002). L'effetto positivo del rolipram è stato accertato da ulteriori studi (Gong et al., 2004) in cui un breve trattamento col farmaco migliorava i deficit sia dell'LTP che dell'apprendimento spaziale in modelli animali di AD (APP/PS1 mice) con effetti a lungo termine che permanevano dopo la somministrazione. Questo effetto protettivo era forse dovuto alla stabilizzazione del circuito sinaptico tramite la modificazione dell'espressione genica stimolata dalla cascata AMPc/PKA/CREB che rende le sinapsi più resistenti all'insulto provocato dall'Aβ.

Da questi studi si evince che l'Aβ ha diversi target (Mattson, 1997) che a loro volta attivano diverse cascate di secondi messaggeri. L'identificazione di queste cascate è oggetto di studio da parte di vari ricercatori che mirano a scoprire l'effetto potenziale di farmaci che possano limitare i danni provocati dall'Aβ.

# *Cap. 3 - Utilizzo degli inibitori delle Fosfodiesterasi 5 in modelli animali di Malattia di Alzheimer*

## *3.1 NO: funzione neuroprotettiva o neurotossica?*

Diverse linee di ricerca suggeriscono che l'NO possa essere coinvolto nella patogenesi dell'AD con un ruolo contrastante, visto che molti studi ne indicano un ruolo protettivo, mentre altri lo vedono responsabile dei fenomeni di neurotossicità. Da ciò che è stato finora detto, si comprende come questa molecola possa a volte avere effetti apparentemente opposti, in relazione alla sede di produzione, alla NOS interessata, alla fine regolazione che ne determina l'azione. Inoltre, abbiamo già accennato alla divergenza dei diversi studi effettuati, ad esempio sull'effettivo coinvolgimento della molecola nei fenomeni di plasticità sinaptica ippocampale, discordanza spesso dovuta alle differenti condizioni sperimentali utilizzate. Il fatto che l'NO possa essere coinvolto nell'AD è comunque supportato da diversi lavori, seppure, come già detto, con diversi ruoli.

Molti studi hanno conferito all'NO un ruolo protettivo nei confronti del danno indotto dall'Aβ nell'AD sia a livello nervoso che vascolare. Alcuni studi sull'apoptosi indotta dall'Aβ hanno dimostrato che il sistema NO/GMPc/PKG ha un ruolo protettivo. Wirtz-Brugger e Giovanni (Wirtz-

Brugger e Giovanni, 2000) hanno dimostrato che la morte cellulare indotta dall'Aβ è soppressa dall'uso di donatori di NO, analoghi del GMPc o inibitori delle PDE. Troy et al. (2000) hanno visto che il trattamento con donatori di NO protegge dalla morte cellulare Aβ-indotta, mentre l'inibizione della NOS non ha effetto, suggerendo che non è la formazione del perossinitrito ad essere critica ma la caspasi-2 che media l'apoptosi indotta dall' Aβ42 *in vitro*.

Anche la produzione di NO vascolare da parte dell'eNOS è stata chiamata in causa, visto che tra i fattori di rischio dell'AD c'è la diminuita produzione di NO da parte dell'endotelio (McCarty, 1998). L'applicazione di Aβ, oltre a promuovere vasocostrizione, diminuisce la produzione dell'NO per diminuzione della fosforilazione dell'eNOS e aumento della resistenza cellulare all'NO (Paris et al., 1999). Ciò suggerisce che l'Aβ possa downregolare il sistema NO/GMPc e ciò è convalidato dal fatto che l'uso di inibitori selettivi delle GMPc-PDE blocca la vasocostrizione indotta da Aβ (Paris et al., 2000). Inoltre, composti che aumentano i livelli di GMPc prevengono l'infiammazione della microglia indotta dall'Aβ (Paris et al., 2000). Infine, è stato dimostrato che l'APP esercita un'azione protettiva grazie all'aumento del GMPc intracellulare e all'attivazione della PKG (Mattson et al., 1999).

Molti autori hanno investigato il ruolo neurotossico della molecola, focalizzando l'attenzione sul ruolo dell'iNOS e quindi sul coinvolgimento della microglia nei fenomeni flogistici che si verificano in risposta alla

presenza di Aβ. Diversi studi hanno infatti dimostrato che la neurotossicità Aβ–mediata è supportata da un aumento della produzione di NO catalizzato dall'iNOS. Tran et al. hanno dimostrato che l'infusione intracerebroventricolare cronica di Aβ1-40 induce espressione dell'mRNA per l'iNOS nell'ippocampo e accumulo dei metaboliti dell'NO (Tran et al., 2001). Inoltre, il trattamento con inibitori dell'iNOS durante l'infusione con Aβ previene il deterioramento del rilascio di acetilcolina invocato dalla nicotina; anche l'apprendimento spaziale e la radial arm maze sono ripristinati in ratti infusi con Aβ. Haass et al. hanno dimostrato che l'Aβ causa un aumento dell'iNOS in vitro a carico delle cellule gliali, aumento presente anche nelle cortecce di pazienti con AD (Haass et al., 1992). Il fatto che l'Aβ attivi la microglia e promuova la sintesi di NO è stato visto anche da Xie et al. con esperimenti effettuati su co-culture di microglia e neuroni di ratto la cui stimolazione con LPS o con $A\beta_{42}$ + IFN-α era seguita da generazione di superossido e/o perossinitrito (Xie et al., 2002). Questa neurotossicità era bloccata da inibitori della sintesi dell'NO e da catalizzatori della decomposizione dei perossinitriti dimostrando che il perossinitrito può essere il mediatore della tossicità Aβ-indotta nella microglia attivata nell'AD (Xie et al., 2002). Altri studi hanno rivelato che la tossicità da Aβ a livello mitocondriale, esplicantesi attraverso la produzione di radicali liberi dell'ossigeno può essere mediata da meccanismi che coinvolgono i recettori NMDA e la NOS (Parks et al., 2001). Anche Monsonego et al. hanno considerato cruciale l'attivazione

della microglia della risposta immune ai siti delle placche di Aβ nel SNC, dimostrando che l'apoptosi da cellule T può essere prevenuta in presenza di un inibitore dell'iNOS (Monsonego et al., 2003).

Dagli studi citati si evince che l'apparente effetto contrastante dell'NO potrebbe essere dovuto alle diverse NOS, e quindi ai diversi tipi cellulari, studiati. In particolare, si può notare come l'iNOS e la microglia siano coinvolte nel danno neuronale da NO, mentre l'nNOS e l'eNOS, cioè le forme costitutive che agiscono in modo $Ca^{++}$-dip., siano chiamate in causa per il loro effetto neuroprotettivo. A tal proposito, molto interessante uno studio di Law et al. che confronta l'espressione proteica e l'attività di nNOS and iNOS in ratti giovani e anziani, alcuni dei quali con moderato danno cognitivo. Questo studio dimostra che l'espressione ippocampale di nNOS è significativamente diminuita negli animali anziani, mentre gli animali giovani mostrano una diminuzione dell'espressione dell'iNOS, in relazione al deficit cognitivo riscontrato (Law et al., 2002).

Inoltre, un feed-back negativo regola la produzione di NO tramite l'iNOS della microglia. Se la sintasi non ha il feed-back, la produzione non controllata del gas può promuovere lo stress ossidativo e nitrosativo tramite la generazione di perossinitrito. In accordo con questi risultati, livelli fisiologici di NO sono stati associati con la sua produzione da parte delle forme costitutive di NOS, mentre la disfunzione sinaptica e la morte cellulare sono correlate all'attivazione dell'iNOS. Quindi, è solo l'eccessiva

produzione di NO ad avere effetti patologici, mentre piccole quantità di NO sono importanti per il corretto svolgimento dei processi fisiologici.

### *3.2 Il sistema NO/GMPc è coinvolto nella disfunzione sinaptica indotta dall'Aβ*

Visto che i sistemi AMPc/PKA ed NO/GMPc/PKG convergono sul fattore di trascrizione CREB per mantenere l'LTP (Lu et al., 1999), in precedenti studi condotti nei nostri laboratori abbiamo studiato il coinvolgimento del sistema NO/GMPc/PKG/CREB nella soppressione della plasticità sinaptica Aβ-indotta (Puzzo et al., 2005). Lo studio, effettuato su fettine di ippocampo di topo in vitro, ha dimostrato che l'utilizzo del donatore di NO 2-(*N*,*N*-dethylamino)-diazenolate-2-oxide diethylammonium salt (DEA/NO), dello stimolatore della GCs 3-(4-amino-5-cyclopropylpyrimidine-2-yl)-1-(2-fluorobenzyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-b]pyridine, o degli analoghi del GMPc 8-bromo-cGMP e 8-(4-chlorophenylthio)-cGMP ripristina l'alterazione dell'LTP indotta dall'Aβ. Inoltre, questi composti hanno ristabilito l'aumento della fosforilazione di CREB che si verifica fisiologicamente dopo il tetano. È stato infine visto che l'Aβ blocca l'aumento di GMPc post-tetano e che il DEA/NO ristabilisce questo fenomeno. Questi risultati suggeriscono dunque che, nei fenomeni di plasticità sinaptica, uno dei target dell'Aβ è il sistema NO/GMPc/CREB (Puzzo et al., 2005).

Partendo da questi presupposti, il mio studio ha voluto investigare se l'utilizzo di farmaci che agiscono sul sistema NO/GMPc possa avere effetti

positivi sui danni della plasticità sinaptica e della memoria presenti in modelli animali di Malattia di Alzheimer.

## *3.3 Effetti delle fosfodiesterasi 5 sulla plasticità sinaptica e sulla memoria in modelli animali di Malattia di Alzheimer*

### 3.3.1 Introduzione

Le fosfodiesterasi (PDE) sono enzimi che rompono il legame fosfodiesterico dei nucleotidi ciclici, AMPc e GMPc. In tal modo le PDEs partecipano alla regolazione della trasduzione del segnale rendendo la risposta cellulare specifica e consentendo l'attivazione dei terzi messaggeri. Negli ultimi decenni sono stati sviluppati diversi farmaci che inibiscono le PDE e quindi aumentano i livelli di nucleotidi ciclici. In particolare, gli inibitori delle PDE5 consentono l'up-regulation del sistema NO/GMPc tramite l'aumento del GMPc. Gli inibitori delle PDE5 sono attualmente impiegati per trattare la disfunzione erettile e l'ipertensione polmonare. Considerato che:

i) le PDE5 sono espresse in diverse aree cerebrali associate a fenomeni di plasticità sinaptica, quali l'ippocampo, la corteccia e il cervelletto (Van Staveren et al., 2003, 2004);

ii) il sistema NO/cGMP è coinvolto nei fenomeni di apprendimento e memoria;

iii) è stato dimostrato che gli inibitori selettivi delle PDE5, sildenafil e vardanafil, innalzano i livelli di GMPc ippocampale migliorando la memoria in ratti (Prickaerts et al., 1997) e topi (Baratti e Boccia, 1999);

iv) il sistema NO/cGMP è down-regolato dall'Aβ (Puzzo et al., 2005);

abbiamo voluto testare se gli inibitori delle PDE5, ripristinando i livelli di GMPc, potessero migliorare le alterazioni della plasticità sinaptica e della memoria su modelli animali di Malattia di Alzheimer.

Tra gli inibitori delle PDE5, abbiamo scelto il sildenafil poiché attraversa la barriera ematoencefalica, è utilizzato da diversi anni per il trattamento della disfunzione erettile, ed ha quindi effetti collaterali conosciuti e un buon follow-up. Esso rappresenta quindi il farmaco più idoneo della sua categoria per gli studi nel SNC. Inoltre è il più selettivo per le PDE5 rispetto a tutti gli iso-enzimi, compresa la PDE1, che essendo presente a livello miocardico ed ematico potrebbe causare vasodilatazione e tachicardia (Daugan et al., 2003).

Nel presente studio è stato dimostrato che il sildenafil produce un miglioramento delle funzioni sinaptiche, della fosforilazione di CREB, della memoria e una riduzione dei livelli di Aβ nei topi APP/PS1. Questi topi, modelli di Malattia di Alzheimer, sono doppi transgenici che manifestano mutazioni sia del precursore della proteina amiloide (APP; K670N,M671L) che delle preseniline 1 (PS1; M146L).

### 3.3.2 Materiali e metodi

Animali - Sono stati utilizzati topi doppi transgenici, che esprimono sia la mutazione per il gene APP (K670M:N671L) che per il gene PS1 (M146L), ottenuti dall'accoppiamento tra topi APP e PS1. come controllo sono stati utilizzati topi wild type (WT) ottenuti dalla stessa colonia (*littermates*). Per identificare il genotipo degli animali è stata utilizzata la PCR (*polymerase chain reaction*) su campioni di DNA estratti dalla coda (Trinchese et al., 2004). Le colonie di animali sono state mantenute in stanze a temperatura e umidità controllata, con cicli luce-buio di 12h. Cibo e acqua sono stati forniti *ad libitum.*

Preparazione delle fette di ippocampo ed elettrofisiologia - Tutti gli esperimenti sono stati effettuati su topi maschi di 3 mesi. Gli animali sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale seguita da decapitazione. L'ippocampo è stato rapidamente rimosso e fette trasversali di 400 μm sono state tagliate e trasferite in una cameretta per la registrazione elettrofisiologica dove sono state mantenute a 29° C, ossigenate con una soluzione al 95% di $O_2$ e al 5% di $CO_2$ e perfuse con liquido cefalorachidiano artificiale (ACSF in mM: 124.0 NaCl, 4.4 KCl, 1.0 $Na_2HPO_4$, 25.0 $NaHCO_3$, 2.0 $CaCl_2$, 2.0 $MgSO_4$, 10.0 glucosio). Le registrazioni extracellulari sono state effettuate stimolando le fibre collaterali di Schaeffer tramite un elettrodo bipolare di tungsteno e registrando nello strato radiato di CA1 tramite un elettrodo di vetro

contenente ACSF, come precedentemente descritto (Vitolo et al., 2002). È stata registrata una *baseline* di 15 minuti ad un'intensità corrispondente al 35% circa della massima risposta evocata. L'LTP è stata indotta usando una stimolazione tetanica *theta-burst* (4 impulsi a 100 Hz, con i *bursts* ripetuti a 5 Hz e ogni tetano formato da 3 treni di 10 *bursts* separati da 15 secondi). Le risposte sono state registrate per 2 ore dopo il tetano, misurate come pendenza (*slope*) del potenziale post-sinaptico eccitatorio di campo (fEPSP) ed espresse come percentuale della *baseline*. I risultati sono stati espressi come media ± errore standard.

Farmaci - Il sildenafil, sintetizzato in 6 fasi secondo le metodiche riportate (Terrett et al., 1996; *US Patent 5,346,901.1994*), è stato fornito dalla Columbia University. Come controllo è stato utilizzato il tadalafil, inibitore delle PDE5 che però non passa la barriera emato-encefalica. Anche il tadalafil è stato sintetizzato e fornito dalla Columbia University secondo le procedure riportate (Daugan et al., 2003). Il tadalafil è stato diluito in DMSO allo 0.1%. L'IC354 è stato fornito dalla ICOS Corp.

Immunocitochimica - Gli esperimenti di immunocitochimica per fosfo-CREB sono stati effettuati come precedentemente descritto (Lu et al., 1999). Le fette ippocampali sono state fissate in paraformaldeide al 4% sia 1 minuto che 60 minuti dopo il tetano. Le fette sono state poi lavate 3 volte in PBS, trattate con Triton X-100 0.3% per 60 minuti, lavate nuovamente 3

volte in PBS, trattate con cloruro d'ammonio 50 mM per 20 minuti e incubate in siero di capra al 10% per 60 minuti. Le fette sono state incubate con l'anticorpo primario (anti-p-CREB policlonale di coniglio - Upstate Biotechnology) diluito 1:100 in siero di capra al 10% per 36 ore a 4°C. Le fette sono state poi lavate in PBS (6 volte, 2 ore ognuna), incubate con l'anticorpo secondario (capra anti-coniglio coniugato con Alexa Fluor 488, Molecular Probes), diluito 1:100 in siero di capra al 10%, per 12 ore a 4°C, lavate nuovamente in PBS (6 volte, 2 ore ognuna). Le fette sono state esaminate tramite microsopia confocale (Nikon D-Eclipse C1) usando due diversi obiettivi (4X e 16X). Per ogni immagine è stata considerata la media Kalman di 4 scansioni. L'analisi è stata eseguita con il software dell'NIH. Per ogni fetta è stata considerata l'intensità di fluorescenza media rispetto al background nell'area CA1 dei corpi cellulari. I valori sono stati normalizzarti rispetto ai valori di fette di controllo non trattate dello stesso animale ed espressi come media percentuale del controllo ± errore standard. La specificità dell'immunofluorescenza è stata confermata omettendo l'anticorpo primario con conseguente riduzione dell'intensità dell'immunofluorescenza. Per valutare l'immunofluorescenza del GMPc è stato utilizzato lo stesso metodo. In questi esperimenti l'attività delle fosfodiesterasi è stata bloccata aggiungendo IBMX (1 ∓M) alla soluzione. Le fette sono state fissate a 10 secondi, 5 e 60 minuti dopo il trattamento. Come anticorpo primario è stato utilizzato un anticorpo policlonale di coniglio anti-GMPc (Chemicon International) diluito 1:300 in siero di capra.

Analisi statistica - Sono stati usati il *t*-test e l'ANOVA a due vie. Il livello di significatività è stato settato a livelli di $P<0.05$.

Somministrazione delle sostanze

Sono stati costituiti quattro gruppi:

1. topi APP/PS1 trattati con veicolo (acqua bidistillata);
2. topi APP/PS1 trattati con sildenafil;
3. topi WT trattati con veicolo;
4. topi WT trattati con sildenafil.

Per gli esperimenti volti a valutare gli effetti acuti dell'inibizione delle PDE5 sulla plasticità sinaptica, il Sildenafil (50nM), il Taldalafil (50 nM) o l'IC354 (1 μM) sono stati direttamente veicolati nella cameretta di registrazione in modo da per fondere le fettine ippocampali per dieci minuti prima della stimolazione tetanica.

Per lo studio della memoria tramite i test comportamentali, il farmaco è stato somministrato tramite iniezione intraperitoneale alla concentrazione di 3mg/kg subito dopo il training. Questa dose raggiunge la concentrazione ippocampale di GMPc di 2.5 μM. Per testare gli effetti a lungo termine del Sildenafil sono state eseguite iniezioni intraperitoneali ogni giorno per tre settimane alla concentrazione di 3 mg/kg. Ultimato il trattamento, abbiamo atteso un periodo di circa 9-12 settimane prima di effettuare i test comportamentali. Sono stati effettuati i test comportamentali di *fear*

*conditioning* (FC) e *radial arm water maze* (RAWM). Quindi, gli animali sono stati sacrificati per effettuare le registrazioni elettrofisiologiche.

Non avendo riscontrato differenze nel FC che nella RAWM somministrando il sildenafil prima del training, verranno riportati solo gli esperimenti in cui le iniezioni ip sono state effettuate subito dopo il training.

Studi comportamentali

Fear conditioning – Il FC è un test cognitivo rapido che si basa sul concetto del condizionamento dell'animale che associa uno stimolo neutro con uno stimolo nocivo (Gong et al., 2004). Il test è stato effettuato ponendo l'animale in un'apposita camera di condizionamento insonorizzata e dotata di una finestra di plexiglas trasparente che permette di filmare il comportamento dell'animale tramite una videocamera connessa ad un software (Freezeframe software). La camera di condizionamento era provvista di una griglia tramite cui viene somministrato uno shock elettrico. Per gli esperimenti di condizionamento (cued e contextual conditioning), è stata prima effettuata una fase di training in cui i topi sono stati posti nella camera per 2 minuti, quindi è stato somministrato un suono (stimolo condizionato - SC) della durata di 30 sec a 2800 Hz e 85 dB. Negli ultimi 2 sec dell'SC, è stato somministrato uno shock elettrico (stimolo incondizionato – SI) di 0.50 mA per 2 sec attraverso le barre del pavimento della camera. Dopo aver appaiato SC e SI, il topo è stato lasciato nella camera per altri 30 sec e poi riportato alla gabbia di origine. Il software ha

misurato la risposta fisiologica dell'animale allo stimolo nocivo consistente nel *Freezing behavior*, definito come l'assenza di ogni movimento esclusa la respirazione. Per valutare il *contextual fear learning*, il freezing è stato misurato dopo 24h dal training riponendo il topo nella camera di condizionamento per 5 min. Per valutare il *cued fear learning*, al topo è stato presentato un nuovo contesto (gabbia triangolare con pavimento liscio e odore di vaniglia) per 2 minuti (pre-SC test); quindi, all'animale è stato somministrato l'SC (suono) per 3 minuti ed è stato misurato il *freezing*. È stata inoltre valutata la differente percezione dell'animale allo shock per escludere che le eventuali differenze comportamentali fossero dovute a una diversa sensibilità al dolore. La Fig. 3.1 riassume le varie fasi del test.

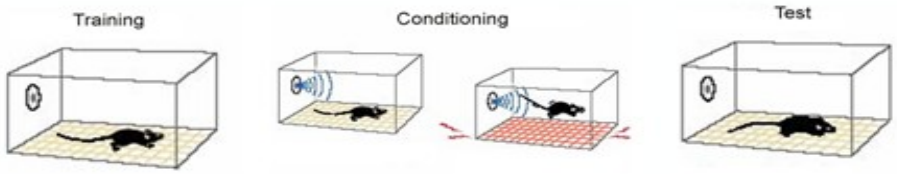


***Fig. 3.1 - Fasi del FC test.*** *Training: l'animale viene posto in un nuovo contesto (camera di condizionamento) per 2 minuti; Condizionamento: viene somministrato un suono (SC) per 30 sec e negli ultimi 2 secondi uno shock elettrico. Test: viene misurato il freezing quando l'animale è riposto nella camera di condizionamento (contextual fear learning) o quando è esposto a un nuovo contesto con somministrazione del suono (cued fear learning).*

Spatial working memory - È un tipo di memoria a breve termine che può essere studiata tramite il test della RAWM (Trinchese et al., 2004). La RAWM consiste di una una vasca bianca, contenente 6 bracci che si irradiano dall'area centrale, riempita di liquido lattescente. Alla fine di uno dei bracci è posizionata una piattaforma trasparente di plexiglass sommersa. Sulle pareti della stanza sono posti dei punti di riferimento spaziali che consentono all'animale di orientarsi (Fig. 3.2). La piattaforma è rimasta nella stessa posizione durante l'esecuzione di ogni prova durante la stessa giornata, ma è stata cambiata di posizione di giorno in giorno in modo casuale. In ogni prova il topo ha iniziato il test da un braccio diverso. In questo modo, il topo non usa la memoria a lungo-termine basandosi sulla locazione della piattaforma del giorno precedente ma la memoria a breve termine dello stesso giorno, basandosi sui punti di riferimento presenti nella stanza. Ogni prova è durata un minuto e gli errori sono stati contati ogni volta che il topo entrava nel braccio sbagliato o impiegava più di 20 sec per raggiungere la piattaforma. Dopo ogni errore il topo è stato riposizionato nel braccio di partenza da cui aveva iniziato la prova. Dopo 4 prove di acquisizione, il topo è stato rimesso nella gabbia per 30 min, e poi è tornato nella vasca per la somministrazione di un ultimo test, quello di ritenzione. Il punteggio ottenuto da ogni topo negli ultimi tre giorni è stato utilizzato per la media e l'analisi statistica. Gli eventuali deficit visuo-motori sono stati valutati tramite l'utilizzo di una piattaforma visibile, indicata da una bandierina nera, posta nella vasca priva dei bracci e che è stata cambiata di

posizione per ogni test. Sono stati somministrati 4 test al giorno per due giorni e sono stati registrati tempo e la velocità con cui l'animale raggiungeva la piattaforma.

***Fig. 3.2: La RAWM è stata utilizzata per testare la spatial working memory.***
*I punti di riferimento spaziali (rappresentati nei 4 angoli) permettono all'animale di riconoscere il contesto in cui è effettuato il test. In relazione alla mappa l'animale è in grado di ritrovare la piattaforma sommersa.*

Reference memory - Questo test è effettuato tramite la *Morris water maze*, come precedentemente descritto (Trinchese et al., 2004). In breve, ai topi è stato somministrato un training di due sessioni al giorno (di 4 ore), ognuna consistente di 3 trials (di 1 minuto ognuno), per 3 giorni, in modo che gli animali utilizzassero la memoria a lungo termine per localizzare la piattaforma. È stato registrato il tempo che il topo ha impiegato per raggiungere la piattaforma nascosta (*latency*). Per testare la ritenzione della memoria spaziale, sono stati effettuati 4 *probe trials*, dopo il training, in cui è stata rimossa la piattaforma. La vasca è stata divisa in 4 quadranti ed è stata valutata la percentuale di tempo speso dall'animale nel quadrante in cui era posizionata la piattaforma nei giorni precedenti, cioè durante il

training. La registrazione e l'analisi del test è stata effettuata tramite un sistema di video tracking (HVS 2020; HVS Image).

Determinazione dei livelli di Aβ

Gli emisferi cerebrali dei topi sono stati pesati ed omogenati in una soluzione contenente 5M guanidine HCL/50 mM Tris HCL. Per la misurazione dei livelli di Aβ40 e Aβ42 è stato usato uno specifico kit per l'ELISA (Aβ umana). I valori sono stati riportati in nanogrammi di Aβ per milligrammo di corteccia.

### 3.3.3 Risultati

***Effetti acuti del sildenafil sulle funzioni sinaptiche in fettine ippocampali di topi APP/PS1***

Abbiamo inizialmente verificato se una breve applicazione di Sildenafil era in grado di riparare il danno dell'LTP in fettine ottenute da animali APP/PS1 dell'età di tre mesi. In questi animali è già presente un'alterazione della plasticità sinaptica, nonostante la trasmissione sinaptica di base (BST) sia normale (Trinchese et al., 2004). La BST, determinata misurando la pendenza del potenziale post-sinaptico eccitatorio in seguito a stimolazioni di crescente intensità, è risultata normale sia nei topi WT che nei doppi transgenici (Fig. 3.3A). Le fettine ippocampali sono state poi perfuse con Sildenafil (50nM) per 10 minuti prima di indurre l'LTP per mezzo di una stimolazione tetanica delle cellule collaterali di Schaeffer. Le fettine di topi

APP/PS1 trattate con sildenafil hanno sviluppato un'LTP maggiore rispetto alle fettine di APP/PS1 trattate con veicolo (Fig. 3.3B). Il sildenafil non ha aumentato invece l'ampiezza dell'LTP nelle fettine ippocampali dei WT paragonate alle fettine di WT non trattate (Fig. 3.3C). Il sildenafil, in assenza di stimolazione tetanica, non ha avuto effetti sulla risposta sinaptica basale per i due gruppi di topi né durante la sua applicazione né a 120 minuti dalla fine dell'applicazione (Fig. 3.3 B,C).

Al fine di controllare la specificità degli effetti del sildenafil sulle PDE5, abbiamo usato il tadalafil, inibitore più selettivo per le PDE5 che non ha effetto né sulle PDE1 né sulle PDE6. Quando le fettine di APP/PS1 sono state perfuse con il tadalafil (50nM, per 10 minuti prima del tetano) l'LTP si è ripristinata (Fig. 3.4A). Il tadalafil non ha modificato la BST né il potenziamento nei topi WT (Fig. 3.4B).

Come ulteriore controllo sulla specificità sulle PDE5 abbiamo usato un inibitore altamente selettivo per le PDE1, chiamato IC354. Diversamente dal sildenafil o dal tadalafil, la perfusione delle fettine di APP/PS1 con IC354 (per 10 minuti prima del tetano), non ha migliorato l'LTP (Fig. 3.4 C). Inoltre, l'IC354 non ha cambiato l'ampiezza del potenziamento nei topi WT (Fig. 3.4 D).

Questi risultati dimostrano che il sildenafil ripristina in modo specifico le alterazioni sinaptiche presenti nei topi APP/PS1.

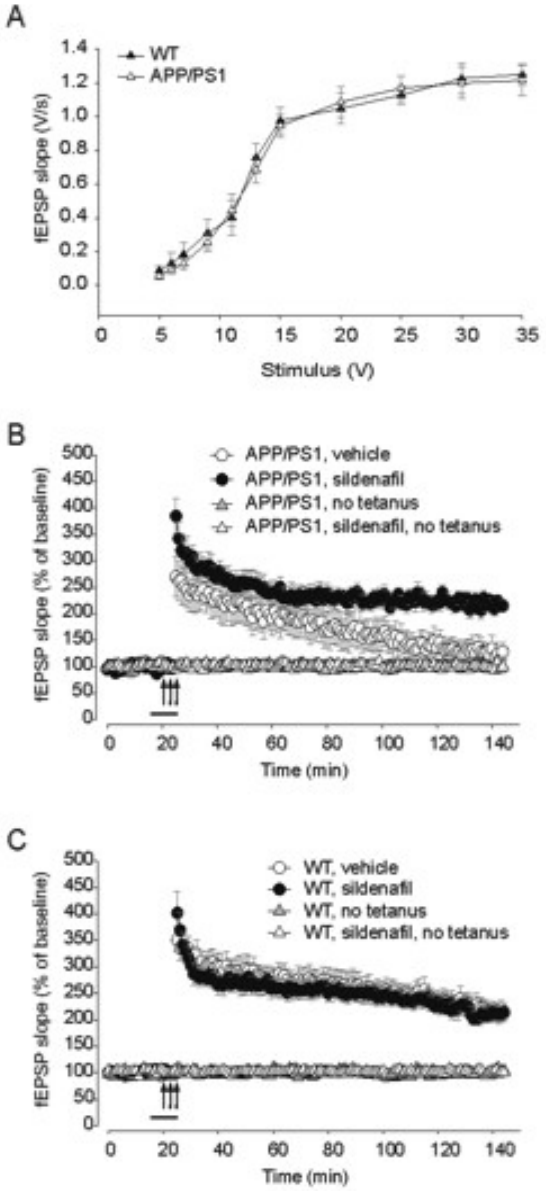


***Fig. 3.3 - Il sildenafil ripristina l'alterazione dell'LTP nella regione CA1 di topi APP/PS1 di 3 mesi.***

***A**, Non ci sono differenze tra la BST dei topi APP/PS1 e WT (P=0.81); **B**, Dopo 10 minuti di perfusione con il sildenafil (50 nM), l'alterazione dell'LTP nei topi APP/PS1 mice è ripristinata (APP/PS1 trattati con sildenafil vs. APP/PS1 trattati con veicolo, P=0.041). L'inibitore non ha avuto effetti sulla trasmissione basale né durante l'applicazione né a 120 minuti (P=0.31). Le frecce indicano l'applicazione del tetano. Le barre rappresentano il tempo di perfusione con le varie sostanze. **C**, Il sildenafil (50 nM) non modifica l'LTP nei topi WT (WT trattati con veicolo vs. WT trattati con sildenafil, P=0.63). L'inibitore non ha avuto effetti sulla trasmissione basale (P=0.62).*

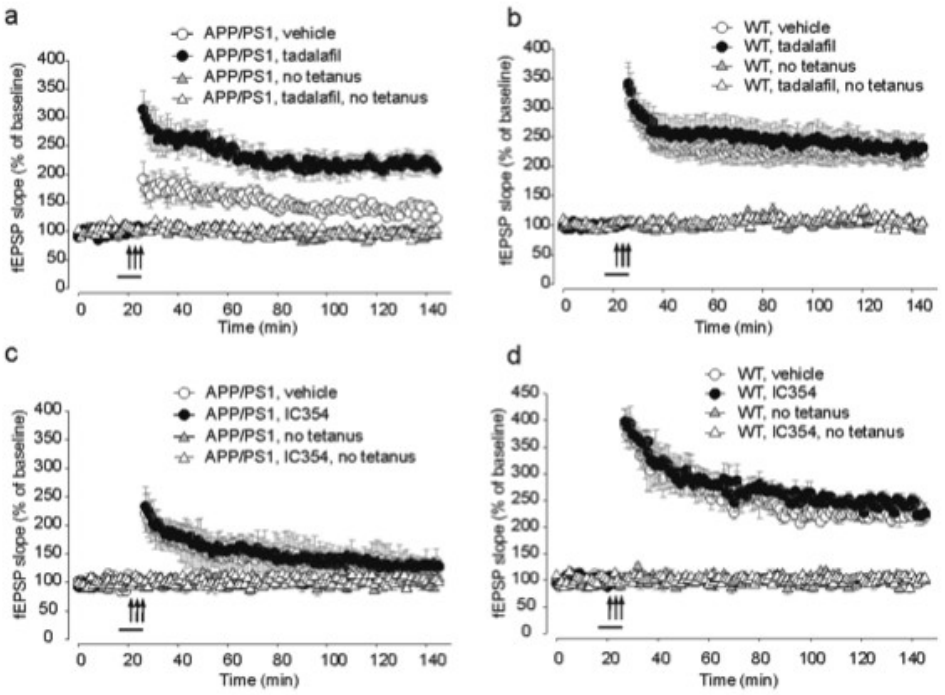


***Fig. 3.4 – L'inibizione delle PDE5 ma non delle PDE1 ripristina l'alterazione dell'LTP nelle fette di ippocampo di topi APP/PS1 di 3 mesi.***

***A,*** *Il tadalafil (50 nM) ripristina l'LTP nei topi APP/PS1 mice (APP/PS1 trattati con tadalafil: 209.49 ⁓ 13.89 % a 120 min. dopo il tetano, n=8 fette da 6 maschi; APP/PS1 trattati con veicolo: 123.14 ⁓ 5.98 %, n=8 fette da 7 maschi; $F_{(1,14)}$=15.57, P=0.001]. Il tadalafil non modifica la trasmissione basale [$F_{(1,6)}$=1.007, P=0.93].*

***B,*** *Il tadalafil non modifica l'LTP [232.45 ± 21.92 % vs. 219.88 ± 19.35 %, n=8/8, $F_{(1,14)}$=0.24, P=0.62) né la trasmissione basale nei topi WT (103.65 ± 1.63 % vs. 104.71 ± 6.13, n=4/4, $F_{(1,6)}$=1.05, P=0.34].*

***C,*** *L'IC354 (1 ∓M) non ripristina l'alterazione dell'LTP nei topi APP/PS1 [APP/PS1 trattati con IC354: 129.33 ⁓ 8.71 %, n=5 fette da 5 maschi; APP/PS1 trattati con veicolo: 126.81 ⁓ 12.39 %, n=5 fette da 5 maschi; $F_{(1,8)}$=0.03, P=0.85]. L'IC354 non modifica la trasmissione basale [$F_{(1,6)}$=0.006, P=0.94].*

***D,*** *L'IC354 non modifica l'LTP nei topi WT [226.05 ± 18.76 % vs. 220.82 ⁓ 9.49 %, n=5/5; $F_{(1,8)}$=0.84, P=0.38]. L'inibitore non ha effetti sulla trasmissione basale [$F_{(1,6)}$=0.072, P=0.79].*

***Effetti acuti del sildenafil sulle funzioni cognitive dei topi APP/PS1***

Come detto precedentemente, il sildenafil è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica. Ciò ha costituito un grande vantaggio nel disegnare gli esperimenti comportamentali. I topi, divisi in 4 gruppi (vd. sezione dei metodi) sono stati trattati con sildenafil (3 mg/kg) o veicolo tramite iniezione ip. La concentrazione di sildenafil è stata scelta sulla base di precedenti studi che hanno dimostrato che questa quantità di sildenafil innalza i livelli di GMPc ippocampali e migliora la memoria nei ratti (e nei topi indipendentemente dagli effetti vascolari.

Inizialmente abbiamo esaminato gli effetti della somministrazione acuta del sildenafil sul *fear conditioning*, un tipo di apprendimento che risulta alterato nei topi APP/PS1 (Gong et al., 2004) e dipende sia dall'ippocampo che dall'amigdala (Phillips e Le Doux, 1992). Non è stata rilevata alcuna differenza nel *freezing* durante la fase di addestramento (*baseline*) nei quattro gruppi di topi (Fig. 3.5 A). Il test di *contextual FC*, effettuato dopo 24h, ha mostrato che i topi APP/PS1 trattati con veicolo presentavano una diminuzione del *freezing* rispetto ai topi WT (Fig. 3.5A). Il trattamento con sildenafil ha migliorato l'apprendimento dei topi APP/PS1, mentre nei topi WT non si è riscontrato un incremento significativo del *freezing* dopo trattamento con l'inibitore delle PDE5 (Fig. 3.5A). Successivamente è stato valutato il *cued FC,* test che non coinvolge la capacità di ritenzione mnemonica e quindi l'ippocampo, e non abbiamo riscontrato differenze di *freezing* tra i vari gruppi.

È stato quindi valutato l'effetto del sildenafil sulla *spatial working memory* tramite il test di RAWM. Questo test, che coinvolge le funzioni ippocampali, risulta alterato nei topi modelli di Alzheimer (Morgan et al., 2000; Trinchese et al., 2004). Gli animali dovevano apprendere e memorizzare la localizzazione della piattaforma nascosta in uno dei bracci usando alcuni riferimenti spaziali. I topi APP/PS1 hanno mostrato gravi anomalie della memoria spaziale nel localizzare la piattaforma sia durante le prove di acquisizione che durante il test di verifica (*retention*) (Fig. 3.5B). I topi transgenici trattati con sildenafil durante le 3 settimane di training (3mg/kg per die), hanno mostrato un miglioramento nel test di ritenzione (Fig. 3.5B). Il trattamento con sildenafil non ha modificato il comportamento dei topi WT (Fig. 3.5B). I quattro gruppi di topi non hanno mostrato differenze nel tempo necessario per l'individuazione della piattaforma (*latency*) e neanche nella velocità di nuoto (*speed*), a dimostrazione che fattori quali visione, coordinazione motoria e motivazione non hanno potuto influenzare e falsare i risultati ottenuti con questo test (Fig. 3.6 A,B).

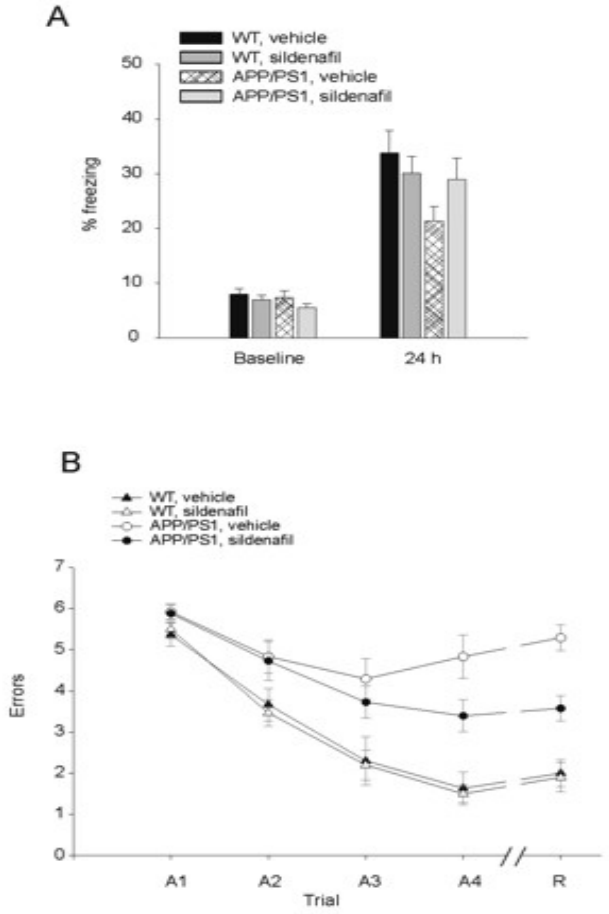


***Fig. 3.5 - Il sildenafil migliora i disordini cognitivi nei topi APP/PS1 di 3 mesi.***
***A,*** *Il sildenafil (3 mg/Kg, i.p.) migliora il contextual FC nei topi APP/PS1 mice di 3 mesi. I topi APP/PS1 e WT non mostrano differenze di freezing durante il training (baseline; $F_{(3,79)}$=2.39, P=0.07), mentre il contextual FC effettuato 24 ore dopo il training mostra una diminuzione del freezing nei topi APP/PS1 trattati con veicolo rispetto ai WT [APP/PS1: 21.36 ± 3.94%, n=21 (12 maschi e 9 femmine), vs. 33.81 ± 4.05% nei topi WT, n=20 (11 maschi e 9 femmine), $F_{(1,39)}$=6.64, P=0.01]. Il trattamento con sildenafil migliora il deficit riscontrato nei topi APP/PS1 mice (28.95 ± 3.94%, n=22 (12 maschi e 10 femmine); $F_{(1,40)}$=0.73, P=0.39). ma non ha effetti sui topi WT [30.1 ± 3.11%, n=20 (11 maschi e 9 femmine); $F_{(1,38)}$=0.52, P=0.47).* ***B****, Il sildenafil (3 mg/Kg, i.p.) migliora la spatial working memory nei topi APP/PS1 di 3 mesi. I topi APP/PS1 trattati con veicolo non imparano la posizione della piattaforma nascosta [APP/PS1: 5.91 ± 0.19 errori nel primo trial di acquisizione (A1), 4.83 ± 0.52 errori nel quarto trial (A4), e 5.29 ± 0.31 errori nel test di richiamo (R), n=8 (4 maschi e 4 femmine); WT: A1=5.36 ± 0.27 errori, A4=1.63 ± 0.39 errori, R=2.00 ± 0.32 errori, n=10 (5 maschie e 5 femmine); ($F_{(1,16)}$=39.66, P<0.0001; i due gruppi sono risultati significativamente diversi nei trials A2 (P=0.05), A3 (P=0.02), A4 ed R (P=<0.0001)]. Il trattamento con sildenafil ha migliorato la performance dei topi doppi transgenici [A1=5.87 ± 0.22 errori, A4=3.39 ± 0.39 errori, R=3.57 ± 0.31 errori, n=11 (6 maschi e 5 femmine); $F_{(1,17)}$=5.99, P=0.02, i due gruppi sono risultati significativamente diversi nei trials A4 (P=0.03) ed R (P=0.001)]. Il sildenafil non ha modificato la performance dei WT [sildenafil: A1=5.5 ± 0.23 errori, A4=1.5 ± 0.21 errori, R=1.9 ± 0.35 errori, n=10 (5 maschi e 5 femmine); $F_{(1,18)}$=0.09, P=0.76).*

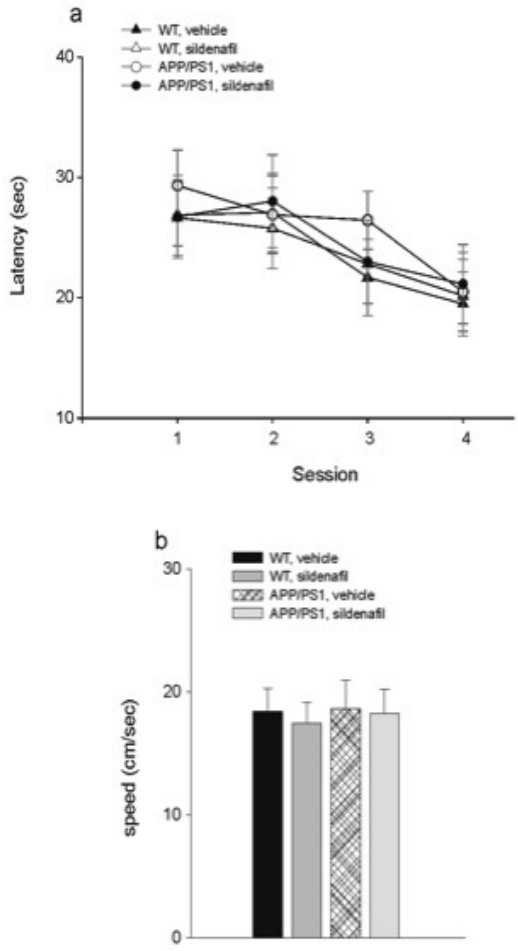


***Fig. 3.6 - I topi APP/PS1 non mostrano alterazioni visuo-spaziali a 3 mesi.***
***A****, I 4 gruppi di animali non mostrano differenze nel tempo richiesto a trovare la piattaforma [APP/PS1 trattati con sildenafil: 26.73 ± 3.43 secondi nella prima sessione e 21.14 ± 3.28 secondi nella quarta sessione; APP/PS1 trattati con veicolo: 29.33 ± 4.62 secondi e 20.49 ± 4.20 secondi nella prima e quarta sessione, rispettivamente, WT trattati con sildenafil: 26.64 ± 3.11 e 20.17 ± 4.01 secondi; WT trattati con veicolo: 26.88 ± 2.58 e 19.49 ± 2.65 secondi;* $F_{(3,35)} = 0.02$, $P=0.994$*].*
***B,*** *Nessuna differenza è stata rilevata nella velocità di nuoto tra i 4 gruppi [APP/PS1 trattati con sildenafil: 18.21 ± 1.96 cm/s; APP/PS1 trattati con veicolo: 18.65 ± 2.31 cm/s; WT trattati con sildenafil: 17.42 ± 1.72 cm/s; WT trattati con veicolo: 18.42 ± 1.81 cm/s,* $F_{(3,35)} = 0.073$; $P=0.974$*]*

Per escludere la possibilità che gli effetti del sildenafil sul comportamento fossero imputabili alla sua azione sul distretto vascolare, i test comportamentali sono stati effettuati somministrando agli animali il tadalafil, farmaco che non è in grado di passare la barriera ematoencefalica. Il tadalafil (1mg/kg) non ha migliorato l'apprendimento associativo dei topi APP/PS1. Ciò implica che l'effetto del sildenafil non è dovuto alla sua azione a livello vascolare (Fig. 3.7).

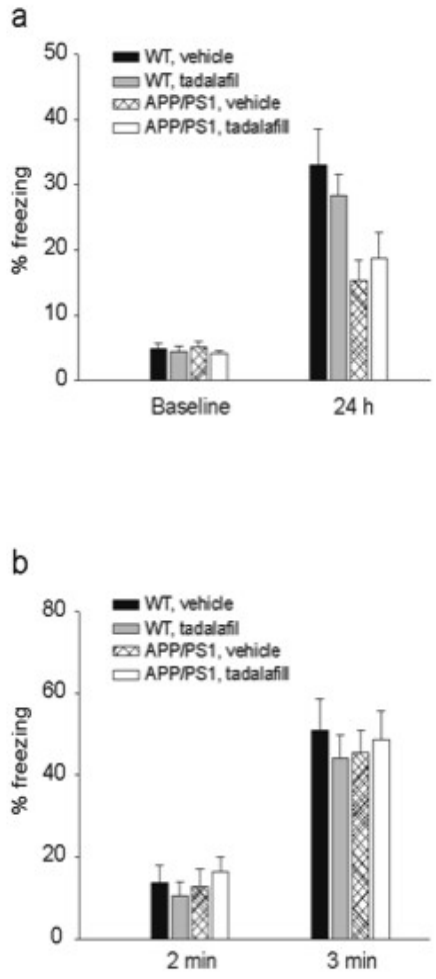

***Fig. 3.7 - Il tadalafil non migliora i deficit sinaptici nei topi APP/PS1 di 3 mesi.***
***A,*** *Il tadalafil (1 mg/Kg, i.p.) non modifica il contextual FC negli APP/PS1 di 3 mesi. APP/PS1 e WT trattati con tadalafil o veicolo non mostrano differenze nel freezing prima del training [$F_{(3,39)}$=0.26, P=0.853]. Il contextual FC effettuato 24 ore dopo il training mostra una riduzione del freezing nei topi APP/PS1 trattati con veicolo [APP/PS1: 15.34 ± 3.15%, n=12 (6 maschi e 6 femmine); vs. 33.03 ± 5.52% nei WT, n=10 (5 maschi e 5 femmine), $F_{(1,20)}$=8.19, P=0.011] che non è migliorata dal trattamento con tadalafil [APP/PS1+tadalafil: 18.76 ± 3.89%, n=8 (4 maschi e 4 femmine) $F_{(1,18)}$=0.08, P=0.778].*
***B****, Il tadalafil non modifica il cued FC nei 4 gruppi di topi [$F_{(3, 39)}$=0.21, P=0.884].*

### *Effetti prolungati del sildenafil sulle funzioni cognitive dei topi APP/PS1*

Studi precedenti hanno dimostrato che gli effetti benefici del rolipram, inibitore delle PDE4, sulle anomalie sinaptiche e cognitive dei topi APP/PS1 persistono oltre i tempi di somministrazione (Gong et al., 2004). Questa scoperta ha aperto una grande prospettiva terapeutica nell'uso dei farmaci che facilitano la fosforilazione di CREB nella patologia di Alzheimer: un breve periodo di trattamento potrebbe apportare benefici a lunga scadenza. Abbiamo quindi verificato se è possibile ottenere lo stesso effetto utilizzando gli inibitori delle PDE 5. A tale scopo, i topi APP/PS1 e WT sono stati trattati quotidianamente con iniezioni ip di sildenafil alla concentrazione di 3 mg/kg. Dopo il trattamento i topi sono stati messi a riposo farmacologico per 9-12 settimane, quindi sono stati sottoposti ai test comportamentali. Allo stesso modo che per gli esperimenti in acuto, i topi APP/PS1 trattati con sildenafil hanno manifestato un netto miglioramento della performance cognitiva nel contextual FC rispetto ai topi trattati con veicolo (Fig. 3.8A).

Questi dati indicano che il trattamento con sildenafil è in grado di proteggere dalle alterazione dell'apprendimento contestuale per periodi che vanno oltre la sua durata di somministrazione (effetto prolungato).

È stato poi testato l'effetto prolungato del sildenafil sulla *spatial working memory* tramite il test di RAWM. Come precedentemente dimostrato (Trinchese et al., 2004), sono state riscontrate differenze significative nel numero di errori commessi dai topi APP/PS1 rispetto ai WT (Fig. 3.8B). La somministrazione di sildenafil per tre settimane a 3 mesi ha ridotto significativamente il deficit cognitivo dei topi APP/PS1 testati a 6-8 mesi (Fig. 3.8B).

Questi dati indicano che il trattamento con sildenafil di topi APP/PS1 a 3 mesi è in grado di proteggere la *spatial working memory* nei topi APP/PS1 con un effetto prolungato che si mantiene dopo 9-12 settimane.

Per indagare gli effetti sulla memoria a lungo termine abbiamo testato la *reference memory* con la *Morris Water Maze,* test che richiede l'integrità delle funzioni ippocampali (Schenk e Morris, 1985), e che risulta essere alterata nei topi APP/PS1 di sei mesi (Trinchese et al., 2004). Dopo sei sessioni di esperimenti, i topi transgenici trattati con veicolo richiedevano tempi significativamente più lunghi per localizzare la piattaforma nascosta rispetto ai topi WT (Fig. 3.8C). Invece, i topi transgenici che erano stati precedentemente trattati con il sildenafil hanno dimostrato notevoli miglioramenti nelle loro prove. Dal momento che sui topi WT il trattamento non ha apportato alcun miglioramento, le prove hanno dato esito simile nei

topi trattati con veicolo o sildenafil (Fig. 3.8C). È stato quindi valutato il *probe test* (Schenk e Morris, 1985). Dopo aver rimosso la piattaforma dall'acqua, all'animale è stato permesso di cercarla per 60 secondi. È stato così evidenziato che i topi WT trattati con veicolo hanno trascorso più tempo all'interno del *target quadrant* (TQ), il quadrante corrispondente all'area dove si trovava la piattaforma al momento del training, piuttosto che al di fuori (Fig. 3.8D). Il sildenafil ha migliorato le perfomance dei topi APP/PS1, i quali hanno trascorso periodi significativamente più lunghi all'interno del TQ (Fig. 3.8D), rispetto agli APP/PS1 trattati con veicolo.

I test per valutare le performance visuo-spaziali non hanno rilevato differenze tra i 4 gruppi di animali.

***Effetti prolungati del sildenafil sulle funzioni sinaptiche dei topi APP/PS1***

Dopo i test comportamentali, gli animali sono stati sacrificati per effettuare le registrazioni elettrofisiologiche e valutare gli effetti prolungato del sildenafil sulla funzione sinaptica. I topi transgenici dell'età di 6-8 mesi presentavano una diminuzione della forza sinaptica (BST) rispetto ai topi di 3 mesi (Trinchese et al., 2004). Il trattamento con sildenafil a 3 mesi ha prodotto un miglioramento della BST misurata a 6-8 mesi nei topi APP/PS1 (Fig. 3.9 A). Il sildenafil non ha modificato le risposte nei topi WT. Il sildenafil ha avuto un effetto benefico anche sull'LTP dei topi APP/PS1 (Fig. 3.9B), mentre non ha modificato il potenziamento registrato nei topi

WT (Fig. 3.9C). Non sono state rilevate differenze tra i quattro gruppi nella trasmissione basale in assenza di stimolazione tetanica (Fig. 3.9B, C).

L'insieme di questi dati indica che il trattamento con il sildenafil dei topi A PP/PS1 a 3 mesi protegge dalle disfunzioni sinaptiche valutate a 6-8 mesi.

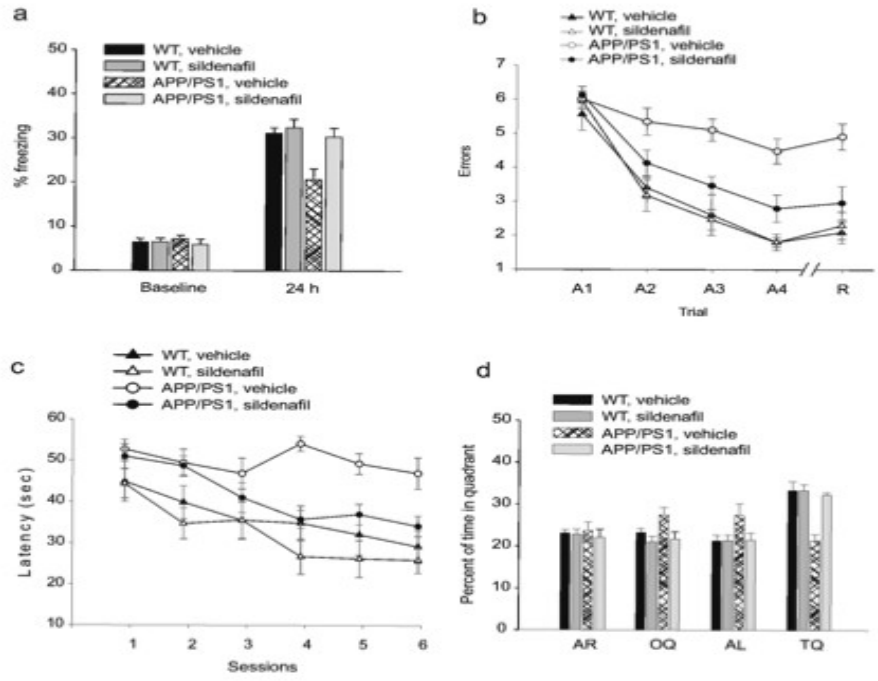


***Fig. 3.8 - Il sildenafil somministrato nei topi APP/PS1 di 3 mesi (3 mg/Kg die, i.p., per 3 settimane) migliora la memoria associative e spaziale nei topi APP/PS1 di 6-8 mesi.***

***A**, Il sildenafil migliora la memoria contestuale nei topi transgenici. Dopo 24 ore, la riduzione del freezing riscontrata nei topi APP/PS1 è ripristinata dal sildenafil [APP/PS1+sildenafil: 30.32 ± 1.98%, n=12 (7 maschi e 5 femmine); APP/PS1+veicolo: 20.66 ± 2.42%, n=17 (10 maschi, 7 femmine), $F_{(1,27)}$=7.10, P=0.013]. Il sildenafil non modifica il freezing nei WT [WT+sildenafil: 32.41 ± 1.88%, n=17 (10 maschi, 7 femmine); WT+veicolo: 31.16 ± 1.21%, n=14 (8 maschi, 6 femmine), $F_{(1,29)}$=0.28, P=0.06].*

***B**, La disfunzione mnemonica riscontrata con il test della RAWM nei topi APP/PS1 è ripristinata dal sildenafil [APP/PS1 vs. WT, n=7/7, $F_{(1,12)}$=31.96, P=0.0001; la differenza è risultata significativa dopo A2 (P=0.001)]. Il sildenafil ha migliorato la performance dei topi APP/PS1 [n=8; $F_{(1,13)}$=30.40, P=0.0001 paragonati ai topi APP/PS1+veicolo; la differenza è risultata significativa dopo A2 (P=0.035)] ma non ha modificato la performance dei WT [n=7; $F_{(1,12)}$=0.01, P=0.916 paragonati ai WT+veicolo].*

***C**, La performance dei topi APP/PS1 nella Morris water maze è migliorata dal trattamento con sildenafil. I topi transgenici trattati con veicolo trascorrono 46.65 ± 3.79 secondi per trovare la piattaforma nascosta dopo 6 sessioni, mentre ai WT bastano 28.91 ± 3.94 secondi [n=11/12, $F_{(1,21)}$=13.73, P=0.001; la differenza è significativa dopo la quarta sessione, P=0.001]. Il trattamento con sildenafil riduce il tempo necessario a trovare la*

*piattaforma nei topi APP/PS1 rispetto ai topi trattati con veicolo (33.86 ± 2.46 secondi; n=10, [$F_{(1,19)}$=8.81, P=0.008)]; la differenza è risultata significativa dopo la quarta sessione (P=0.0001). Il sildenafil non modifica le performance dei WT (25.64 ± 3.16 secondi; n=13, $F_{(1,23)}$=0.81; P=0.376).*

***D**, Nel probe test, i transgenici trattati con il sildenafil trascorrono meno tempo nel target quadrant (TQ), dove la piattaforma era posizionata durante il training, rispetto ai transgenici trattati con veicolo [32.24 ± 0.46% vs 21.39 ± 1.46%, $F_{(1,19)}$=12.17, P=0.002]. I WT trascorrono il 33.37 ± 2.10% del tempo nel TQ (TQ vs. AR, OQ, AL, P=0.03, P=0.04, P=0.02, rispettivamente). I WT trattati con sildenafil trascorrono il 33.35 ± 1.38% del tempo ne l TQ [$F_{(1,423)}$=0.001, P=0.998 paragonati ai WT trattati con veicolo].*

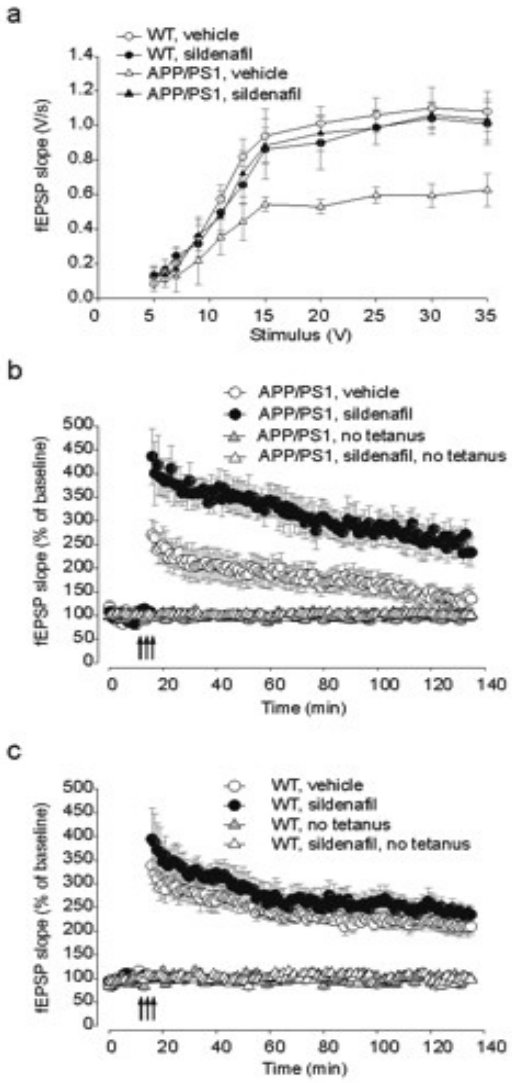


***Fig. 3.9 - Il trattamento giornaliero con sildenafil per 3 settimane in topi APP/PS1 di 3 mesi, ripristina la BST e l'LTP negli stessi topi testati a 6-8 mesi.***

***A**, L'alterazione della BST negli APP/PS1 animals è migliorata dal trattamento con sildenafil (3 mg/Kg, i.p. per 3 settimane all'età di 3 mesi) [APP/PS1+veicolo: 0.62 ⁓ 0.09 V/sec., (n=6 fette da 5 maschi), $F_{(1,9)}$=7.26, P=0.02 rispetto ai WT; APP/PS1+sildenafil: 1.03 ⁓ 0.12 V/sec., (n=8 fette da 6 maschi), $F_{(1,12)}$=5.51, P=0.03 rispetto ai*

*transgenici+veicolo]. Il sildenafil non modifica la BST nei WT [WT+ sildenafil: 1.01 ⁓ 0.12 V/sec. (n=6 da 5 maschi); WT+veicolo: 1.08 ⁓ 0.11 V/sec. (n=5 fette da 5 maschi); $F_{(1,9)}$=0.34, P=0.57].*
***B**, Il sildenafil (3 mg/Kg, i.p. per 3 settimane all'età di 3 mesi) ripristina l'alterazione dell'LTP negli APP/PS1 [APP/PS1+sild: 233.81 ± 30.47 % di baseline a 120 min, n=7 fette da 6 maschi; APP/PS1+veicolo: 135.56 ± 22.02 %, n=7 fette da 6 maschi, $F_{(1,12)}$=14.82, P=0.002].*
***C**, Il sildenafil non modifica l'LTP nei topi WT [WT+sildenafil: 234.67 ± 17.19%, n=7 fette da 6 maschi; WT+veicolo: 210.01 ± 16.62 %, n=7 fette da 6 maschi, $F_{(1,12)}$=2.16, P=0.16]. Non sono state riscontrate differenze nella trasmissione basale dei 4 gruppi di animali (n=4 fette da 4 animali per ogni gruppo, $F_{(3, 12)}$=0.17, P=0.91).*

### *Effetti del sildenafil sulla fosforilazione del CREB e sui livelli di Aβ nei topi APP/PS1*

Il CREB è implicato nella regolazione dell'espressione genica nella formazione e stabilizzazione della memoria a lungo termine. La fosforilazione del CREB è necessaria affinché possa legarsi alle proteine e stimolare l'espressione genica (Silva et al., 1998). Gli elevati livelli di Aβ sono ritenuti responsabili del blocco della fosforilazione di CREB che fisiologicamente si verifica dopo una stimolazione tetanica (Puzzo et al., 2005; Gong et al., 2006). Nel presente lavoro abbiamo misurato i livelli di fosforilazione del CREB nei topi transgenici e WT trattati o meno con il sildenafil. Le fettine ippocampali sono state trattate come descritto negli esperimenti di elettrofisiologia, poi fissate per 60 minuti, esposte all'anticorpo anti-fosfoCREB (Ser-133) ed osservate al microscopio confocale. Come precedentmente dimostrato (Lu et al., 1999; Puzzo et al., 2005) nei topi WT si riscontra un'aumentata densità nell'immunofluorescenza dei corpi cellulari dell'area CA1 in seguito alla stimolazione tetanica rispetto alle fettine non stimolate (Fig. 3.10 A, B). I

topi APP/PS1, invece, non hanno mostrato l'incremento della immunofluorescenza in seguito alla stimolazione tetanica (Fig. 3.10 A, B). Il sildenafil ha ripristinato il normale incremento di fosforilazione nelle fettine tetanizzate dei topi transgenici (Fig. 3.10 A, B). Il trattamento con sildenafil non ha modificato l'immunofluorescenza nei topi WT dopo stimolazione tetanica (Fig. 3.10 A, B).

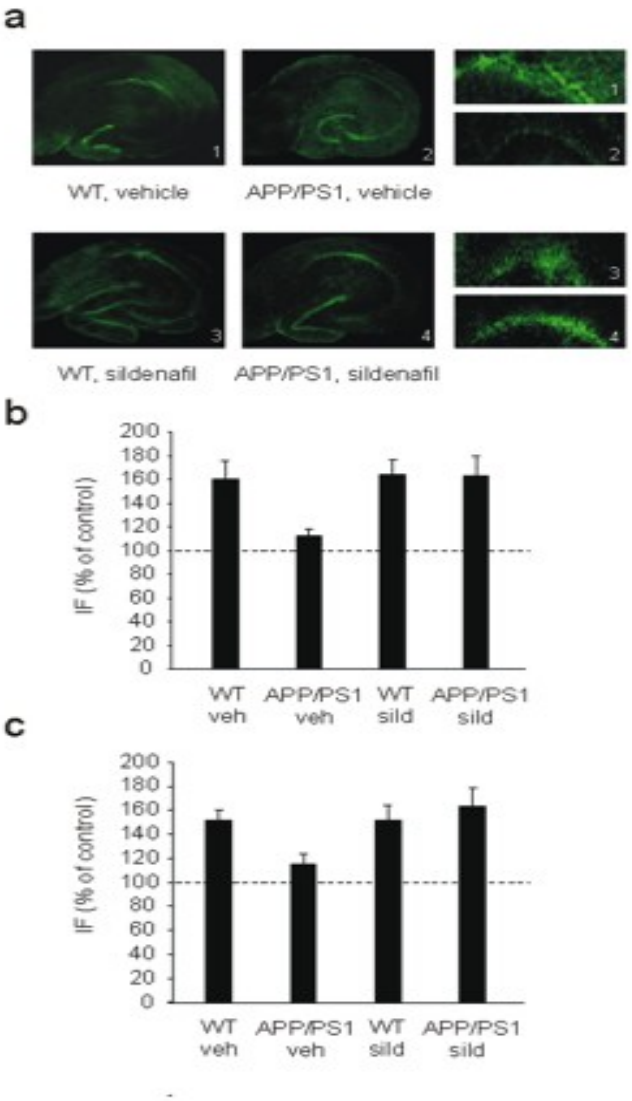

***Fig. 3.10 - Il sildenafil ripristina l'aumento nella forforilazione di CREB dopo il tetano nei topi APP/PS1.***

***A**, Fette ippocampali fissate con anticorpo anti-pCREB 60 minuti dopo il trattamento con veicolo o sildenafil (50 nM) in animali di 3 mesi. A sinistra**,** ingrandimento 4X; a destra, ingrandimento 16X delle cellule piramidali dell'area CA1.*

***B**,L'immunofluorescenza nell'area CA1 dopo il tetano non aumenta nei topi APP/PS1 di 3 mesi (WT: 160.51 ± 14.96% del controllo, n=4; $t_{(6)}$=3.44, P=0.014 vs. fette di controllo non tetanizzate; APP/PS1: 111.89 ± 6.62% del controllo, n=4; $t_{(6)}$=2.96, P=0.025 vs. fette tetanizzate). Il sildenafil (sild) ripristina l'aumento della fosforilazione di CREB nei topi APP/PS1 dopo il tetano mentre non modifica i livelli di p-CREB nelle fette di WT tetanizzate (APP/PS1+sildenafil: 162.58 ± 17.09% del controllo, n=4; $t_{(6)}$=0.09, P=0.93; WT+sildenafil: 163.54 ± 13.52% del controllo, n=4; $t_{(6)}$=0.15, P=0.88 vs. fette di WT tetanizzate).*

***C,** Il trattamento giornaliero con sildenafil (3 mg/Kg, i.p. per 3 settimane in APP/PS1 di 3 mesi) ristabilisce l'aumento di CREB tetano-indotto nelle fette ottenute dagli stessi animali all'età di 6-8 mesi (WT: 151.60 ± 8.25% del controllo, n=4/4; $t_{(6)}$=4.70, P=0.003 vs. fette non tetanizzate; APP/PS1: 114.96 ± 9.12% del controllo, n=4, $t_{(6)}$=2.96, P=0.025, vs. fette metanizzare di WT; APP/PS1+sildenafil: 163.6 ± 15.14% del controllo, n=4; $t_{(6)}$=0.69, P=0.53 vs. fette tetanizzate di WT; ($t_{(6)}$=2.75, P=0.041 vs. fette tetanizzate di APP/PS1). Il sildenafil non modifica i livelli di p-CREB nei WT (151.73 ± 12.24% del controllo, n=4, $t_{(6)}$=0.009, P=0.993, vs. fette tetanizzate di WT).*

Risultati simili sono stati ottenuti nei topi che erano stati trattati a 3 mesi, quotidianamente e per tre settimane, con sildenafil (3 mg/kg) o con veicolo, e che sono stati poi testati a 6-8 mesi. Anche in questo caso, i topi WT hanno manifestato una maggiore densità di immunofluorescenza dopo il tetano rispetto alle fettine di controllo (Fig. 3.10C). Nei topi doppi transgenici non si è verificato l'incremento della fosforilazione in seguito alla stimolazione tetanica, ma il trattamento con sildenafil ha ripristinato tale alterazione (Fig. 3.10C). In ogni caso, l'immunofluorescenza per fosfo-CREB nei topi WT non si è modificata dopo il trattamento con l'inibitore delle PDE5 (Fig. 3.10C).

### 3.3.4 Discussione

Il presente studio dimostra che il trattamento con l'inibitore delle PDE5 sildenafil ripristina i deficit sinaptici e mnemonici nei nodelli di topi transgenici di Malattia di Alzheimer. Il sildenafil ripristina anche l'aumento della fosforilazione del fattore di trascrizione CREB e contrasta gli effetti negativi esercitati dagli elevati livelli di Aβ sulla funzione sinaptica, sulla memoria e sulla fosforilazione di CREB. Questi effetti non sono solo esercitati acutamente, ma persistono dopo 9-12 settimane dalla somministrazione del farmaco. Infine, il sildenafil causa una riduzione dei livelli di $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$. Questi risultati supportano la teoria che gli inibitori delle PDE5 contrastano i deficit della fosforilazione di CREB causati dall'Aβ non solo immediatamente, ma dopo un prolungato periodo di tempo, tramite la regolazione della trascrizione di geni che controllano i processi di sintesi e degradazione dell'Aβ.

Un risultato rilevante del nostro studio è il ripristino delle funzioni mnemoniche nei topi APP/PS1 dopo l'inibizione delle PDE5. Questi risultati sono in accordo con precedenti osservazioni in cui molecole NO-mimetiche ripristinano il deficit cognitivo causato dalla scopolamina (Thatcher et al., 2004), o dalla deplezione colinergica (Bennett et al., 2007), suggerendo che la stimolazione del sistema di trasduzione NO/cGMP può essere utilizzato come target terapeutico nei disordini della memoria.

È interessante notare che l'effetto della somministrazione i.p. sildenafil si manifesta entro una precisa finestra temporale. Infatti, il farmaco è efficace

solo se somministrato subito dopo il training sia del FC che dei test di RAWM e MWM. Considerato che l'emivita del sildenafil *in vivo* è di 0.4 ore nei roditori (Walker et al., 1999), la finestra temporale in cui i processi di apprendimento possono essere modificati dall'inibitore delle PDE5 consiste dei primi 20-25 minuti dopo lo shock elettrico o l'acquisizione del task spaziale. Inoltre, ciò indica che il farmaco agisce sui meccanismi di consolidamento della memoria.

Un altro risultato importante concerne l'effetto benefico del sildenafil sulla disfunzione sinaptica riscontrata nei topi APP/PS1. Ciò è in accordo con precedenti studi effettuati su fettine di ippocampo in vitro in cui è stato dimostrato che l'aumento del GMPc, ottenuto tramite l'utilizzo di donatori di NO o di analoghi del GMPc, ripristinava la riduzione di LTP e l'inibizione di p-CREB dovute all'applicazione esogena di Aβ (Puzzo et al., 2005). Visto che le modificazioni della funzione sinaptica sono un aspetto fondamentale del declino cognitivo nell'AD (Masliah, 1995), gli inibitori delle PDE5 rappresenterebbero una classe di composti molto utili per contrastare la disfunzione sinaptica nelle malattie della memoria.

Nel presente lavoro è stato inoltre dimostrato che il sildenafil riduce i livelli di Aβ nei topi transgenici studiati. Questi risultati sono in accordo con precedenti osservazioni in cui è stato osservata la diminuzione dell'Aβ in topi APP/PS1 in seguito all'utilizzo di farmaci che rilasciano NO, quali l'NCX-2216 (Jantzen et al., 2002). Inoltre, è stato dimostrato che la delezione genetica dell'enzima NOS2 provoca un aumento dei livelli di Aβ

nei topi che overesprimono l'APP (Colton et al., 2006). La riduzione dei livelli di Aβ persiste per 3-5 dopo la fine della somministrazione del farmaco. Considerato che il sildenafil ha una breve emivita, questo effetto potrebbe essere dovuto ad un'azione sull'espressione di geni che regolano la produzione o la clearance dell'Aβ.

Il CREB è coinvolto nella regolazione di geni che partecipano alla formazione e alla stabilizzazione della memoria a lungo termine, probabilmente tramite la formazione di nuove connessioni sinaptiche. Quando il p-CREB si lega al CBP, esso stimola l'espressione di CRE. Le funzioni del CBP quale co-attivatore che facilita le interazioni dei fattori di trascrizione agendo come un'acetiltransferasi che catalizza l'acetilazione dell'istone H3 della cromatina, causa una diminuzione della repressione cromosomale e un aumento dei geni di trascrizione associati alla memoria. L'acetilazione istonica può auto-perpetuarsi creando una cromatina in stato funzionalmente stabile e quindi cambiamenti cronici nella proporzione dell'espressione di specifici geni (Battaglioli et al., 2002; Lunyak et al., 2002; Turner, 2002). Quindi, un'ipotesi interessante potrebbe essere che gli effetti positivi prolungati del sildenafil siano causati da un permanente aumento dell'acetilazione istonica. In accordo con tale ipotesi abbiamo recentemente dimostrato che l'inibizione della deacetilazione istonica, normalmente dovuta a un gruppo di enzimi con effetto opposto al CBP, ristabiliscono l'LTP e la memoria nei topi APP/PS1 mice (Francis et al. in *Soc Neurosci. Abstr.* 548.545, San Diego, 2007).

L'effetto del sildenafil ricorda per molti aspetti il rolipram, un inibitore delle PDE4 che provoca una umento dei livelli di AMPc e che attiva CREB tramite la PKA in studi sperimentali effettuati con lo stesso paradigma sperimentale utilizzato nel presente lavoro (Gong et al., 2004). Inoltre, diversi inibitori non specifici delle PDE, quali la caffeina, la papaverina e l'isobutylmethylxanthine migliorano le performance comportamentali, probabilmente antagonizzando i recettori per l'adenosina o agendo sui depositi intracellulari di $Ca^{2+}$ (Villiger and Dunn, 1981; Randt et al., 1982; Nicholson, 1990; Nehlig et al., 1992). Nonostante ciò, l'effetto del sildenafil sembra essere specificatamente dovuto all'inibizione delle PDE5, visto che il tadalafil, un altro inibitore selettivo delle PDE5 riproduce l'effetto del sildenafil sulla dissunzione sinaptica, mentre l'IC354, un inibitore selettivo delle PDE1 (Daugan et al., 2003), non migliora l'LTP nelle fette ippocampali dei topi doppi transgenici. Differentemente dal rolipram, il sildenafil agisce sulla *spatial working memory* subito dopo la sua somministrazione. Un'altra differenza sostanziale tra sildenafil e rolipram riguarda l'effetto sui liveli di Aβ che sono ridotti dall'applicazione del primo ma non vengono modificati dal rolipram.

Quando una nuova classe di farmaci viene proposta come agente terapeutico è importante considerare gli effetti collaterali. Proprio gli effetti collaterali potrebbero aver determinato il fallimento degli inibitori delle PDE4 come agenti terapeutici nel trattamento dei deficit mnemonici. Un vantaggio

dell'utilizzo degli inibitori delle PDE5 consiste nel fatto che sono molecole già usate da diversi anni e se conoscono bene gli effetti collaterali. Inoltre, recentemente, l'FDA ha approvato l'uso cronico del tadalafil.

Tra gli effetti collaterali si annovera il priapismo, anche se ultimamente è stato dimostrato che questa condizione possa derivare da una disregolazione della funzione delle PDE5 dovuta alla down-regulation dell'NO (Champion et al., 2005) – provocata anche dall'aumento dei livelli di Aβ (Puzzo et al., 2005) – tanto che, paradossalmente, gli inibitori delle PDE5 sono stati proposti come agenti terapeutici nella cura del priapismo (Burnett et al., 2006; Rajfer et al., 2006). Altri effetti collaterali degli inibitori delle PDE5 consistono nei modici fenomeni vasodilatatori responsabili di cefalea, flushing, dispepsia, congestione nasale, rinite. È da considerare che, anche se l'Aβ si accumula principalmente nel SNC, essa è anche presente a livello plasmatico nei pazienti affetti da AD ed altri disordini neurologici caratterizzati da abnorme produzione di Aβ (Basun et al., 2002; Andreasen et al., 2003). Quindi, l'Aβ sistemica potrebbe potenziare la vasocostrizione non solo nel circolo cerebrale ma in altri distretti del sistema vascolare (Pasquier and Leys, 1998; Khalil et al., 2002; Kalaria, 2003; Suhara et al., 2003; Gentile et al., 2004; Price et al., 2004). Inoltre, visto che l'ipertensione è spesso associata all'AD (Pasquier and Leys, 1998; Gentile et al., 2004; Price et al., 2004), sarebbe interessante testare l'effetto degli inibitori delle PDE5 non solo sul SNC, ma sui sintomi vascolari che spesso colpiscono i pazienti con AD.

## *Bibliografia*


1. Agullo L, Garcia A. 1992. Characterization of noradrenaline-stimulated cyclic GMP formation in brain astrocytes in culture. *Biochem J*, 288:619-24.
2. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357:593–615.
3. Amaducci L, Bruno G, Lippi A. 1990. Le demenze. In: Psichiatria medica (di Cassano GB) *Utet*, Milano.
4. Andreasen N, Sjogren M, Blennow K. 2003. CSF markers for Alzheimer's disease: total tau, phospho-tau and Abeta42. *World J Biol Psychiatry,* 4:147-155.
5. Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD. 1995. Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3', 5' -cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature*, 376:74-80.
6. Arancio O, Kiebler M, Lee CJ, et al. 1996. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell*, 87:1025-1035.
7. Arispe N, Rojas E, Pollard HB. 1993. Alzheimer disease amyloid b protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:567–571.
8. Bagetta G, Corasaaiti MT, Melino G, et al. 1993. Lithium and tacrine increase the expression of nitric oxide synthase mRNA in the hippocampus of rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 197:1132-39.
9. Bannerman DM, Chapman PF, Kelly PA, et al. 1994. Inhibition of nitric oxide synthase does not impair spatial learning. *J Neurosci*, 14:7404-14
10. Baratti CM, Boccia MM. 1999. Effects of sildenafil on long-term retention of an inhibitory avoidance response in mice. *Behav Pharmacol*, 10:731-7.
11. Basun H, Nilsberth C, Eckman C, Lannfelt L, Younkin S. 2002. Plasma levels of Abeta42 and Abeta40 in Alzheimer patients during treatment with the acetylcholinesterase inhibitor tacrine. *Dement Geriatr Cogn Disord,* 14:156-160.
12. Battaglioli E, Andres ME, Rose DW, Chenoweth JG, Rosenfeld MG, Anderson ME, Mandel G. 2002. REST repression of neuronal genes requires components of the hSWI.SNF complex. *J Biol Chem,* 277:41038-41045.
13. Bennett BM, Reynolds JN, Prusky GT, Douglas RM, Sutherland RJ, Thatcher GR. 2007. Cognitive deficits in rats after forebrain cholinergic depletion are reversed by a novel NO mimetic nitrate ester. *Neuropsychopharmacology*, 32:505-513.
14. Berezovska O, Lleo A, Herl LD, et al. 2005. Familial Alzheimer's disease presenilin 1 mutations cause alterations in the conformation of presenilin and interactions with amyloid precursor protein. *J Neurosci*, 25:3009-17.
15. Berbabeu R, Schmitz P, Faillace MP, et al. 1996. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport*, 7:585-8.

16. Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory : long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361:31-39.
17. Bliss TVP, Douglas RM, Errington ML, et al. 1986. Correlation between long-term potentiation and release of endogenous amino acids from dentate gyrus of anaesthetized rats. *J Physiol*, 377:391-408.
18. Blokland A, de Vente J, Prickaerts J, et al. 1999. Local inhibition of hippocampal nitric oxide synthase does not impair place learning in the Morris water escape task in rats. *Eur J Neurosci*, 11:223-32.
19. Bohme GA, Bon C, Lemaire M, et al. 1993. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:9191-4.
20. Bohme GA, Bon C, Stutzmann J-M, et al. 1991. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol*, 199:379-81.
21. Boje KM, Arora PK. 1992. Microglialproduced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediates neuronal cell death. *Brain Res*, 587:250-56.
22. Bon C, Bohme GA, Doble A, et al. 1992. A role for nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Neurosci*, 4:420-24.
23. Bon CL, Garthwaite J. 2001. Exogenous nitric oxide causes potentiation of hippocampal synaptic transmission during low-frequency stimulation via the endogenous nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Neurosci*, 14:585-94.
24. Bonhoeffer T, Staiger V, Aertsen A. 1989. Synaptic plasticity in rat hippocampal slice cultures: local "Hebbian" conjunction of pre- and postsynaptic stimulation leads to distributed synaptic enhancement. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:8113-17.
25. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, et al. 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 351:714-18.
26. Bredt DS, Snyder SH. 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 692-85.
27. Bredt DS, Snyder SH. 1992. Nitric Oxide a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8:3-11.
28. Brenman J, Bredt D. 1996. Nitric oxide signaling in the nervous system. *Meth Enzymol*, 269:119-29.
29. Brunton L. 1867. On the use of nitrite of amyl in angina pectoris. *Lancet*, ii:97–8.
30.
31. Burnett AL, Bivalacqua TJ, Champion HC, Musicki B. 2006. Long-term oral phosphodiesterase 5 inhibitor therapy alleviates recurrent priapism. *Urology*, 67:1043-1048.
32. Calzal L, Giardino L, Ceccatelli S. 1993. NOS mRNA in the paraventricular nucleus of young and old rats after immobilization stress. *NeuroReport*, 4:627-30.
33. Ceccatelli S, Eriksson M. 1993. The effect of lactation on nitre oxide synthase gene expression. *Brain Res*, 625:177-79.
34. Champion HC, Bivalacqua TJ, Takimoto E, Kass DA, Burnett AL. 2005. Phosphodiesterase-5A dysregulation in penile erectile tissue is a mechanism of priapism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:1661-1666.
35. Chapman PF, Atkins CM, Allen MT, et al. 1992. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuroreport*, 3:567-70.

36. Chetkovich DM, Klann E, Sweatt JD. 1993. Nitric oxide synthase-independent long-term potentiation in area CA 1 of hippocampus. *NeuroReport*, 4:919-22.
37. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, et al. 1992. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*, 360:672-4.
38. Citron M. 2004. Beta-secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease--promise and challenge. *Trends Pharmacol Sci*, 25: 92-7
39. Colton CA, Vitek MP, Wink DA, Xu Q, Cantillana V, Previti ML, Van Nostrand WE, Weinberg JB, Dawson H. 2006. NO synthase 2 (NOS2) deletion promotes multiple pathologies in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:12867-12872.
40. Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, et al. 1997. Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments. *Neuroreport*, 8:3213-17.
41. Daugan A, Grondin P, Ruault C, Le Monnier de Gouville AC, Coste H, Linget JM, Kirilovsky J, Hyafil F, Labaudiniere R. 2003. The discovery of tadalafil: a novel and highly selective PDE5 inhibitor. 2: 2,3,6,7,12,12a-hexahydropyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-b]indole-1,4-dione analogues. *J Med Chem,* 46:4533-4542.
42. Dineley KT, Westerman M, Bui D, et al. 2001. Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 21:4125-33.
43. Drummond GI. Cyclic nucleotides in the nervous system. 1983. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 15:373-494.
44. Etcheberrigaray R, Ito E, Oka K, et al. 1993. Potassium channel dysfunction in fibroblasts identifies patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:8209–8213.
45. Fezoui Y, Teplow DB. 2002. Kinetic studies of amyloid beta-protein fibril assembly. Differential effects of alpha-helix stabilization. *J Biol Chem*, 277:36948-54.
46. Fin C, da Cunha C, Bromberg E, et al. 1995. Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. *Neurobiol Learn Mem*, 63:113-5.
47. Finckh U, Kuschel C, Anagnostouli M, et al. 2005. Novel mutations and repeated findings of mutations in familial Alzheimer disease. *Neurogenetics*, 6:85-9.
48. Francis SH, Colbran JL, McAllister-Lucas LM, et al. 1994. Zinc interactions and conserved motifs of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase suggest that it is a zinc hydrolase. *J Biol Chem*, 269:22477-80.
49. Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature,* 288:373–6.
50. Gandy S, Martins RN, Buxbaum J. 2003. Molecular and cellular basis for anti-amyloid therapy in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 17:259-66.

51. Gandy S. 2005. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest*, 115:1121–29.
52. Garbers DL. 1992. Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine and autocrine ligands. *Cell*, 71:1-4.
53. Garthwaite J, Boulton CL. 1995. Nitric oxide signalling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*, 57:683-706.
54. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. 1988. Endothelium-derived relaxing release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 336:385-88.
55. Gentile MT, Vecchione C, Maffei A, Aretini A, Marino G, Poulet R, Capobianco L, Selvetella G, Lembo G. 2004. Mechanisms of soluble beta-amyloid impairment of endothelial function. J Biol Chem 279:48135-48142.
56. Giuffrida Stella AM. 2000. The new role for an old enzyme studied by A. Clementi in neurodegenerative disorders [*in Italian*]. *It J Biochem*, 49:1-101.
57. Gong B, Cao Z, Zheng P, Vitolo OV, Liu S, Staniszewski A, Moolman D, Zhang H, Shelanski M, Arancio O. 2006. Ubiquitin Hydrolase Uch-L1 Rescues beta-Amyloid-Induced Decreases in Synaptic Function and Contextual Memory. *Cell,* 126:775-788.
58. Gong B, Vitolo OV, Trinchese F, et al. 2004. Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment. *J Clin Invest*, 114:1624-34.
59. Gribkoff VK, Lum-Ragan JT. 1992. Evidence for nitric oxide synthase inhibitor- sensitive and in sensitive hippocampal synaptic potentiation. *J Neurophysiol*, 68:639-42.
60. Gudi T, Huvar I, Meinecke M, et al. 1996. Regulation of gene expression by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 271:4597-4600.
61. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, et al. 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359:322-5.
62. Haley JE, Malen PL, Chapman PF. 1993. Nitric oxide synthase inhibitors block long-term potentiation induced by weak but not strong tetanic stimulation at physiological brain temperatures in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett*, 1993 160:85-8.
63. Haley JE, Wilcox GL, Chapman PF. 1992. The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 8:211-16.
64. Hawkins RD. 1996. NO honey, I don't remember. *Neuron,* 16:465-7.
65. He W, Barrow CJ. 1999. The A beta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry*, 38:10871-77.
66. Hering C. 1849. Glonoine, a new medicine for headache etc. *Am J Homeopathy*, 4:3.
67. Huber G, Martin JR, Loffler J, Moreau JL. 1993. Involvement of amyloid precursor protein in memory formation in the rat: an indirect antibody approach. *Brain Res,* 603:348-52.
68.

69. Ishida A, Furukawa K, Keller JN, Mattson MP. 1997. Secreted form of β-amyloid precursor protein shifts the frequency dependence for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices. *Neuroreport,* 8: 2133-2137.
70. Itoh A, Akaike T, Sokabe M, et al. 1999. Impairments of long-term potentiation in hippocampal slices of beta-amyloid-infused rats. *Eur J Pharmacol*, 382:167-175.
71. Izumi Y, Zorumski CF. 1993. Nitric oxide and long-term synaptic depression in the rat hippocampus. *Neuroreport*, 4:1131-4.
72. Jantzen PT, Connor KE, DiCarlo G, Wenk GL, Wallace JL, Rojiani AM, Coppola D, Morgan D, Gordon MN. 2002. Microglial activation and beta -amyloid deposit reduction caused by a nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mice. *J Neurosci* ,22:2246-2254.
73. Kalaria RN. 2003. Vascular factors in Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr,* 15 Suppl 1:47-52.
74. Katzoff A, Ben-Gedalya T, Susswein AJ. 2002. Nitric oxide is necessary for multiple memory processes after learning that a food is inedible in aplysia. *J Neurosci*, 22:9581-94.
75. Kayed R, Sokolov Y, Edmonds B, et al. 2004. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem*, 279:46363-66.
76. Khalil Z, Poliviou H, Maynard CJ, Beyreuther K, Masters CL, Li QX. 2002. Mechanisms of peripheral microvascular dysfunction in transgenic mice overexpressing the Alzheimer's disease amyloid Abeta protein. *J Alzheimers Dis,* 4:467-478.
77. Kirchner L, Weitzdoerfer R, Hoeger H, et al. 2004. Impaired cognitive performance in neuronal nitric oxide synthase knockout mice is associated with hippocampal protein derangements. *Nitric oxide*, 11:316-30.
78. Klein WL, Krafft GA, Finch CE. 2001. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci*, 24: 219-24.
79. Knowles RG, Palaeios M, Palmer RMI, et al. 1989. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA,* 89:5159-62.
80. Koh JY, Yang LL, Cotman CW. 1990. Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res*, 533:315-20.
81. Koylu EO, Kanit L, Taskiran D, et al. 2005. Effects of nitric oxide synthase inhibition on spatial discrimination learning and central DA2 and mACh receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 81:32-40.
82. Kuo YM, Emmerling MR, Vigo-Pelfrey C, et al. 1996. Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem*, 271:4077-81.
83. Law A, O'Donnel J, Gauthier S, et al. 2002. Neuronal and inducible nitric oxide synthase expressions and activities in the hippocampi and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired, and impaired Long-Evans rats. *Neuroscience*, 112: 267-275.

84. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, et al. 1997. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *TIBS*, 22:307-312.
85. Loo DT, Copani A, Pike CJ, et al. 1993. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:7951-5.
86. Lu YF, Kandel ER, Hawkins RD. 1999. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurosci*, 19:10250-10261.
87. Lum-Ragan JT, Gribkoff VK. 1993. The sensitivity of hippocampal long-term potentiation to nitric oxide synthase inhibitors is dependent upon the pattern of conditioning stimulation. *Neuroscience,* 57:973-83.
88. Lunyak VV, Burgess R, Prefontaine GG, Nelson C, Sze SH, Chenoweth J, Schwartz P, Pevzner PA, Glass C, Mandel G, Rosenfeld MG. 2002. Corepressor-dependent silencing of chromosomal regions encoding neuronal genes. *Science,* 298:1747-1752.
89. Ma L, Zablow L, Kandel ER, et al. 1999. Cyclic AMP induces functional presynaptic boutons in hippocampal CA3-CA1 neuronal cultures. *Nat Neurosci*, 2:24-30.
90. Macciardi F, Cavallini MC. 1993. A 2-locus model for Alzheimer Disease? *Genetic Epidem*, 10:437-442.
91. Mark RJ, Hensley K, Butterfield DA, et al. 1995. Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca2q homeostasis and cell death. *J Neurosci*, 15: 6239–6249.
92. Masliah E. 1995. Mechanisms of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Histol Histopathol,* 10:509-519.
93. Mattson MP, Cheng B, Davis D, et al. 1992. Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci*, 12: 376-89.
94. Mattson MP, Cheng B, Smith-Swintosky VL. 1993. Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium- and free radical-mediated excitotoxic injury: implications for treating neurodegenerative disorders. *Exp Neurol*, 124: 89-95.
95. Mattson MP. 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev*, 77:1081-1132.
96. McCarty MF. 1998. Vascular nitric oxide may lessen Alzheimer's risk. *Med Hypotheses*, 51:465-476.
97. Merette C, Lehner T, Ott J. 1993. Two new approaches toward linkage heterogeneity of FAD: Two-locus models and age of onset as a discriminator. *Genetic Epidem*, 10:455-460.
98.
99. Monsonego A, Imitola J, Zota V, et al. 2003. Microglia-mediated nitric oxide cytotoxicity of T cells following amyloid beta-peptide presentation to Th1 cells. *J Immunol*, 171:2216-2224.
100. Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. 2000. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature,* 408:982-985.

101. Murphy S, Minor RL Jr, Welk G, et al. 1990. Evidence for an astrocyte-derived vasorelaxing factor with properties similar to nitric oxide. *J Neurochem*, 55:349-51.
102. Murrell W. 1879. Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet*, i: 80–1.
103. Nehlig A, Daval JL, Debry G. 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev,* 17:139-170.
104. Neumann RJ, Rice JP et al. 1993. Linkage analysis of a complex disease: Application to familial Alzheimer Disease. *Genetic Epidem*, 10:419-424.
105. Nicholson CD. 1990. Pharmacology of nootropics and metabolically active compounds in relation to their use in dementia. *Psychopharmacology (Berl),* 101:147-159.
106. Nitsch RM, Farber SA, Growdon JH, et al. 1993. Release of amyloid beta-protein precursor derivatives by electrical depolarization of rat hippocampal slices. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:5191-3.
107. O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel E, et al. 1991. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:11285-89.
108. Ohki K, Yoshida K, Hagiwara M, et al. 1995. Nitric oxide induces c-fos gene expression via cyclic AMP response element binding protein (CREB) phosphorylation in rat retinal pigment epithelium. *Brain Res*, 696:140-144.
109. Pan K-M, Baldwin M, Nguyen J, et al. 1993. Conversion of α-helices into β-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci*, 90:10962–66.
110. Pancheri P, Cassano GB. 1999. Trattato Italiano di Psichiatria, II Edizione. *Masson*: Milano.
111. Paris D, Town T, Parker T, et al. 2000. Beta-Amyloid vasoactivity and proinflammation in microglia can be blocked by cGMP-elevating agents. *Ann NY Acad Sci*, 903:446-450.
112. Paris D, Town T, Parker TA, et al. 1999. Inhibition of Alzheimer's beta-amyloid induced vasoactivity and proinflammatory response in microglia by a cGMP-dependent mechanism. *Exp Neurol*, 157:211-221
113. Parks JK, Smith TS, Trimmer PA, et al. 2001. Neurotoxic Abeta peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro. *J Neurochem*, 76:1050-1056.
114. Pasquier F, Leys D. 1998. Blood pressure and Alzheimer's disease. *Rev Neurol (Paris)*, 154:743-751.
115. Peterson C, Goldman JE. 1986. Alterations in calcium content and biochemical processes in coltured skin fibroblasts from aged and Alzheimer donors. *Proc Natl Acad Sci*, 83:2758-2762.
116. Phillips RG, LeDoux JE. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci,* 106:274-285.

117. Podlisny MB, Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, et al. 2000. The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry*, 39:10831–39.
118. Price JM, Hellermann A, Hellermann G, Sutton ET. 2004 Aging enhances vascular dysfunction induced by the Alzheimer's peptide beta-amyloid. *Neurol Res,* 26:305-311.
119. Prickaerts J, Steinbusch HW, Smits JF, et al. 1997. Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: effects of 7-nitroindazole and zaprinast. *Eur J Pharmacol*, 33:125-36.
120. Puzzo D, Vitolo O, Trinchese F, et al. 2005. Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci*, 25:6887-97.
121. Qiu WQ, Ferreira A, Miller C, et al. 1995. Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *J Neurosci*, 3:2157-67.
122. Rajfer J, Gore JL, Kaufman J, Gonzalez-Cadavid N. 2006. Case report: Avoidance of palpable corporal fibrosis due to priapism with upregulators of nitric oxide. *J Sex Med* , 3:173-176.
123. Randt CT, Judge ME, Bonnet KA, Quartermain D. 1982. Brain cyclic AMP and memory in mice. *Pharmacol Biochem Behav,* 17:677-680.
124. Reiser G. 1990. Endothelin and a Ca2+ ionophore raise cyclic GMP levels in a neuronal cell line via formation of nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 101:722-26.
125. Reiser G. 1990. Mechanisms of stimulation of cyclic-GMP level in a neuronal cell line mediated by serotonin (5-HT3) receptors. Involvement of nitric oxide arachidonic acid metabolism and cytosolic Ca2+. *Eur J Biochem*, 189:547-52.
126. Renbaum P, Levy-Lahad E. 1998. Monogenic determinants of familial Alzheimer's disease: presenilin-2 mutations. *Cell Mol Life Sci*, 54:910-9.
127. Reyes-Harde M, Potter BV, Galione A, et al. 1999. Induction of hippocampal LTD requires nitric-oxide-stimulated PKG activity and Ca2+ release from cyclic ADP-ribose-sensitive stores. *J Neurophysiol*, 82:1569-76.
128. Roberson ED, Sweatt JD. 1996. Transient activation of cyclic AMP-dependent protein kinase during hippocampal long-term potentiation. *J Biol Chem*, 271:30436-30441.
129. Roher AE, Chaney MO, Kuo YM, et al. 1996. Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 271:20631–35.
130. Rossor MN, Newman S, Frackowiak RS, et al. 1993. Alzheimer's disease families with amyloid precursor protein mutations. *Ann NY Acad Sci*, 695:198-202.
131. Russo C, Dolcini V, Salis S, et al. 2002. Signal transduction through tyrosine-phosphorylated Cterminal fragments of amyloid precursor protein via an enhanced interaction with Shc/Grb2 adaptor proteins in reactive astrocytes of Alzheimer’s disease brain. *J Biol Chem*, 277: 35282–88.

132. Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, et al. 1995. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron*, 14:457-66.
133. Salbaum JM, Ruddle FH. 1994: Embryonic expression pattern of amyloid protein precursor suggests a role in differentiation of specific subsets of neurons. *Exp Zool*, 269:116-27.
134. Schaad NC, Vanecek J, Schulz PE. 1994. Photoneural regulation of rat pineal nitric oxide synthase. *J Neurochem*, 62: 2496-99.
135. Schenk F, Morris RG. 1985. Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions. *Exp Brain Res*, 58:11-28.
136. Schuman EM, Madison DV. 1991. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, 254:1503-6.
137. Selkoe DJ. 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science (New York, NY),* 298:789-791.
138. Selkoe DJ, Schenk D. 2003. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43:545-84.
139. Selkoe DJ. 1994. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu Rev Neurosci*, 17:489-517.
140. Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. 1998. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci,* 21:127-148.
141. Son H, Hawkins RD, Martin K, Kiebler M, Huang PL, Fishman MC, Kandel ER. 1996. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell,* 87:1015–1023.
142. Spires TL, Hyman BT. 2005. Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx*, 2:423-37.
143. St George.Hyslop PH. 2000. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 47:183-99.
144. Suhara T, Magrane J, Rosen K, Christensen R, Kim HS, Zheng B, McPhie DL, Walsh K, Querfurth H. 2003. Abeta42 generation is toxic to endothelial cells and inhibits eNOS function through an Akt/GSK-3beta signaling-dependent mechanism. *Neurobiol Aging,* 24:437-451.
145. Susswein AJ, Katzoff A, Miller N, et al. 2004. Nitric oxide and memory. *Neuroscientist*, 10:153-62.
146. Tabaton M, Nunzi MG, Xue R, et al. 1994. Soluble amyloid beta-protein is a marker of Alzheimer amyloid in brain but not in cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Res Commun*, 200:1598-603.
147. Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TV, et al. 1996. The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 3:159-68.
148. Teyke T. 1996. Nitric oxide, but not serotonin, is involved in acquisition of food-attraction conditioning in the snail Helix pomatia. *Neurosci Lett*, 206:29-32.
149. Thatcher GR, Bennett BM, Dringenberg HC, Reynolds JN. 2004. Novel nitrates as NO mimetics directed at Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis,* 6:S75-84.
150. Tran MH, Yamada K, Olariu A, et al. 2001. Amyloid- β- peptide induces nitric oxide production in rat hippocampus: association with cholinergic

dysfunction and amelioration by inducible nitric oxide synthase inhibitors. *FASEB J*, 15:1407-1409.

151. Trinchese F, Liu S, Battaglia F, Walter S, Mathews PM, Arancio O. 2004. Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Ann Neurol,* 55:801-814.
152. Troy CM, Rabacchi SA, Friedman WJ, et al. 2000. Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid. *J Neurosci*, 20:1386-1392.
153. Turner BM. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell,* 111:285-291.
154. Van Staveren WC, Steinbusch HW, Markerink-van Ittersum M, Behrends S, de Vente J. 2004 Species differences in the localization of cGMP-producing and NO-responsive elements in the mouse and rat hippocampus using cGMP immunocytochemistry. *Eur J Neurosci*, 19:2155-2168.
155. Villiger JW, Dunn AJ. 1981. Phosphodiesterase inhibitors facilitate memory for passive avoidance conditioning. *Behav Neural Biol,* 31:354-359.
156. Vitolo OV, Sant'Angelo A, Costanzo V, et al. 2002. Amyloid peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:13217-21.
157. Walker DK, Ackland MJ, James GC, Muirhead GJ, Rance DJ, Wastall P, Wright PA. 1999. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica,* 29:297-310.
158. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, et al. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416:535–539.
159. Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, et al. 2000. The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry*, 39:10831–39.
160. Wang Q, Walsh DM, Rowan MJ, et al. 2004. Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid-b-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-jun n-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci*, 24:3370-3378.
161. Williams JH, Li YG, Nayak A, et al. 1993. The suppression of long-term potentiation in rat hippocampus by inhibitors of nitric oxide synthase is temperature and age dependent. *Neuron*, 11:877-84.
162. Wirtz-Brugger F, Giovanni A. 2000. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate mediated inhibition of cell death induced by nerve growth factor withdrawal and beta-amyloid: protective effects of propentofylline. *Neuroscience*, 99:737-750.
163. Xie Z, Wei M, Morgan TE, et al. 2002. Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide1-42- and lipopolysaccharide-activated microglia. *J Neurosci*, 22:3484-3492.
164. Yamada K, Noda Y, Hasegawa T, et al. 1996. The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 276:460-6.

165. Younkin SG. 1995. Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 37:287-88.
166. Zhang S, Chen J, Wang S. 1998. Spatial learning and memory induce of nitric oxide-producing neurons in rat brain. *Brain Res*, 801: 101-6.
167. Zhuo M, Hu Y, Schultz C, et al. 1994. Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature*, 368:635–639.
168. Zhuo M, Small SA, Kandel ER, et al. 1993. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in the hippocampus. *Science*, 260:1946-50.
169. Zou LB, Yamada K, Tanaka T, et al. 1998. Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacology*, 37:323-30.

## *Ringraziamenti*

Alla mia famiglia: Cristina, mia moglie, Teresa, Chiara e Giuseppe, i miei tesori di figli, che spesso curiosamente hanno sbirciato tra i miei studi, chiedendosi: ma papà alla sua età, studia ancora all'università..?

A mio padre, a mia madre e a mia sorella, cui ho cercato di dare, troppo spesso senza riuscirci, le giuste soddisfazioni che avrebbero meritato.

Al Prof. Salvatore Sapienza, mio tutor, che ho sempre stimato per le sue doti di studioso e gentiluomo, il quale ha donato tutta la sua vita alla scienza e mi ha consentito di raggiungere questo prestigioso traguardo.

Al Prof. Agostino palmeri, mio tutor dopo la quiescenza del Prof. Sapienza, che ha creduto nelle mie capacità consentendomi lo svolgimento di un lavoro sereno, collaborativo e proficuo.

Alla Dott. Daniela Puzzo, validissima ricercatrice, competente e geniale, che oltre ad aver coordinato le mie attività, si è mostrata sempre, con garbo e professionalità, una persona amica, presente e disponibile.

Alla Dott. Lucia Privitera, Lucy, simpatica, affettuosa e preparatissima ricercatrice, amica e collega, che ha saputo sempre intervenire chiarendo i

miei dubbi e perplessità, grazie alla sua esperienza e grande pazienza e disponibilità.

Al Dott. Dario Furnari, Darietto, forse la persona a me più vicina durante questa esperienza di studio. Mio collega di dottorato, ma anche nella formazione pre dottorato. Simpaticamente il mio “alter ego”, persona unica, affidabilissima, un vero amico come tutti vorrebbero avere.

# Grazie!