



Universidad de Navarra

Facultad de Farmacia

**Efectos del Propranolol Sobre el Deterioro Cognitivo y
las Patologías Amiloide y Tau en Distintos Modelos
Experimentales de Enfermedad de Alzheimer**

Marta Dobarro Bugarín

**Efectos del Propranolol Sobre el Deterioro Cognitivo y las Patologías
Amiloide y Tau en Distintos Modelos Experimentales de
Enfermedad de Alzheimer**

Memoria presentada por D^a Marta Dobarro Bugarín para aspirar al grado de Doctor
por la Universidad de Navarra

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

Pamplona, Junio de 2012

Fdo: Dra. María Javier Ramírez Gil

El verdadero éxito reside en el esfuerzo por lograr algo...

El único fracaso es no intentarlo

(Anónimo)

A mis padres

A mi abuela

Hace ya más de cuatro años que tomé la decisión de volver a Pamplona para embarcarme en un mundo para mí desconocido, el mundo de la ciencia. Lo recuerdo como un momento lleno de dudas y de miedo a equivocarme. Ahora que esta etapa ha llegado a su fin, puedo decir que tomé la decisión acertada y que ha merecido la pena. Además de todo lo que he aprendido, me llevo un montón de buenos momentos. Por eso quiero agradecer en estas páginas a todos los que habéis formado parte de mi vida estos años, el apoyo, la amistad y el cariño con el que me habéis tratado. Gracias por unos años inolvidables.

Quisiera agradecer a la Dra. Edurne Cenarruzabeitia por abrirme las puertas del Departamento de Farmacología. Y a Berta, por el ánimo y el cariño con que me has tratado durante todo este tiempo y por tu constante preocupación por todos nosotros.

Gracias Mariaja. Has sido, sin lugar a dudas, una de las personas más importantes, y sin tu ayuda no habría sido posible. Además de convertirme en doctora, estos años han supuesto para mí un montón de cosas más. Y ha sido gracias a ti, por darme esta oportunidad y hacerme un hueco en tu equipo cuando parecía imposible. Gracias por no perder nunca la paciencia, por tus consejos científicos y personales, por tu cariño, y por la seguridad y confianza que has sabido transmitirme cuando he estado a punto de derrumbarme. En definitiva, gracias por tu trabajo a la hora de dirigir esta tesis y por el gran esfuerzo final que ha hecho posible que todo salga bien. Muchísimas gracias.

Gracias al gran equipo que me acogió con tanto cariño en los primeros meses, cuando todo era nuevo para mí. Porque siempre es más agradable trabajar acompañada, pero sobre todo si es de personas como vosotros. A Maite, por ayudarme tanto sin pedir nada a cambio, incluso ahora desde la distancia. Eres un ejemplo de trabajo y esfuerzo y gracias a ti he aprendido todo lo que he necesitado para llegar hasta aquí. Barbi, gracias por un millón de cosas. Por todos esos “momenticos”. Siempre has dejado tus problemas a un lado cuando te he necesitado y no sé qué habría hecho sin las interminables horas de terapia en nuestra covacha rosa. Gracias por ser mi compañera de piso y mi amiga, pero sobre todo, por ser como una hermana para mí. Evitxu, gracias por el cariño que me has

dado desde el primer día y por tu ayuda en el trabajo. Por tus visitillas, por tu risa contagiosa y por estar ahí siempre que he necesitado desahogarme.

Gracias también al resto de la gente que contribuyó a hacerme sentir como en casa en tan poco tiempo. A Alvarito, gracias de tu lil' thing. Por compartir tus "movidas" conmigo. No me olvido de que tenemos una visita pendiente. A Elena, por tu alegría y generosidad con todo el mundo, y porque siempre eres capaz de ponerte en el lugar de los demás. Y a Natalia, por transmitirme tu tranquilidad y serenidad en los momentos clave.

Un agradecimiento especial a mis compis de cuartito durante estos últimos meses. Por todas las horas que hemos pasado juntos. Gracias por aguantarme, soy consciente de que no siempre ha sido fácil. Esta recta final sin vosotros habría sido, sin duda, mucho más dura y aburrida. A Gorka, por darme siempre un punto de vista diferente, por tu paciencia y tus bromas (no sé con quién te vas a meter ahora...). Por decirme siempre las cosas como las piensas. Y por supuesto, por estos últimos meses que te he tenido explotado... mil gracias. A Elitxu. Tú eres la responsable de que aterrizara en el depar y siempre te lo agradeceré. Gracias por todo lo que hemos vivido juntas, antes y durante la tesis. Por tu pasión por las pequeñas cosas, y por estar siempre dispuesta a compartir con todos tu inmenso corazón. A Lucía, por tu amistad, tu compañía en esos viajes interminables y por estar siempre dispuesta a escuchar. Creo que todo el mundo debería aprender algo de ti y de tu capacidad para darle la vuelta a los momentos difíciles con sentido del humor. ¡Te voy a echar mucho de menos!

Por supuesto, muchas gracias a todos los demás. A Lourdes, mi sampeochilla, al fin y al cabo tú también has formado parte de este cuartito de "pretésicas". Gracias por tus mensajitos constantes de ánimo y por todas esas risas en el animalario. A Patxi, por estar siempre dispuesto a echarme una mano cuando lo he necesitado. Gracias Merche, por tu amabilidad y compañerismo. A Manuel y Xabi, por darle un aire nuevo al laboratorio. Os deseo lo mejor a los 3 en esta nueva experiencia que comenzáis. A Luis, por compartir nuestros últimos agobios por el pasillo. A Vero, porque enseguida fuiste una más y por compartir con nosotros algunos de los mejores momentos del departamento. A María,

gracias por tu alegría y tu ilusión. A pesar de llevar tan poco tiempo has sido un gran apoyo durante estos meses. A Mikel, gracias por soportarme siempre con tan buen humor. Ya sé que en el fondo no te parezco tan borde. Y por supuesto a Bea, gracias por volver y darnos la oportunidad de conocerte. Has sido como una doctoranda más y en muchas ocasiones has sido capaz de entenderme mejor que nadie.

Quisiera dar las gracias al resto de personas que llevan tanto tiempo formando el depart de Farma, haciendo que el trabajo diario sea más llevadero. A Rosa, por tu sonrisa, amabilidad y muestras de interés. A Popi, por tratarme siempre con cariño y por los momentos compartidos en el "club de fumadores". A Pili, por tu alegría constante y por estar siempre al pie del cañón, pendiente de cada uno de nosotros. A Mari Luz, gracias por esas miles de muestras que sé que te han vuelto loca. Y porque para mí has sido como una madre y una amiga a la vez. El depart no sería lo mismo sin ti. Gracias a Sandra, Guadalupe e Idoia por los momentos de desconexión al mediodía. Gracias a vosotras quedarse a comer siempre da menos pereza. Y no me olvido Sandri, de todas esas membranas, incubaciones y demás. Muchísimas gracias.

Me gustaría agradecer también a todas aquellas personas que han pasado por el departamento: masterianos, alumnos internos... porque todos habéis dejado vuestra huella de alguna manera.

No puedo olvidarme de la gente que ha estado conmigo día a día fuera del laboratorio, esforzándose por entender todas mis preocupaciones aún sin saber muy bien de qué les estaba hablando.

A Andrea, por todos esos meses que compartimos sofá y ser capaz de aguantar todas nuestras chapas casi sin rechistar. Y por aportar, junto con Tepy, ese punto de locura de la pareja cómico-violenta. Gracias a vosotros también.

A mis niñas de Ferrol, por ser las mejores amigas del mundo. Por todo lo que hemos compartido desde pequeñas. Da igual los meses que pasen sin vernos, porque cuando nos juntamos es como si no hubiera pasado el tiempo.

A ti David, que te ha tocado vivir esta tesis de cerca el último año. Gracias por escucharme y animarme cuando lo he necesitado. Por conseguir ver siempre el lado positivo de las cosas, haciéndolo todo más fácil. Pero sobre todo gracias por ser capaz de sacarme siempre una sonrisa. Para mí ha sido muy importante tenerte a mi lado y espero que siga siendo así por mucho tiempo.

Por último me gustaría dar las gracias a mi familia. Porque aunque nos veamos menos de lo que me gustaría, siempre he recibido vuestro cariño. Especialmente a mis padres, porque gracias a vosotros nunca me he sentido sola. Sois lo más importante y esta tesis es también vuestra. No habría llegado hasta aquí sin vuestro apoyo incondicional durante todos estos años. Gracias por vuestra confianza, vuestros ánimos y por recordarme día a día que soy capaz de muchas cosas. Nunca podré agradeceréoslo lo suficiente. Y a ti, Jul, por todas esas cosas que nos hacen tan diferentes y de las que tengo tanto que aprender: tu seguridad, tu perseverancia y tu paciencia. Estoy segura de que tu empeño y entusiasmo te harán llegar muy lejos en todo lo que te propongas. Pero sobre todo, gracias por estar ahí. Porque pase lo que pase sé que siempre voy a poder contar contigo.

Gracias a todos...

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la financiación del Departamento de Industria del Gobierno de Navarra y el proyecto de Caja Navarra "Tú eliges, Tú decides", y sin la ayuda de la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra.

Abreviaturas más empleadas

A β : péptido β -amiloide

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

AINEs: fármacos antiinflamatorios no esteroideos

ApoE: apolipoproteína E

APP: proteína precursora del β -amiloide

BACE1: β -secretasa

BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro

BHE: barrera hematoencefálica

C83: fragmento carboxilo terminal de 83 aminoácidos

C99: fragmento carboxilo terminal de 99 aminoácidos

CaMKII: quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina

Cdk5: quinasa dependiente de ciclina 5

DM2: diabetes mellitus tipo 2

EA: enfermedad de Alzheimer, Alzheimer's disease (AD)

ECS: estrés crónico suave

FAD: enfermedad de Alzheimer de origen familiar

GC: glucocorticoides

GSK3 β : quinasa glicógeno sintasa 3 β

HFD: dieta hipercalórica, high fat diet

IDE: enzima degradadora de insulina, insulin degrading enzyme

IR: receptor de insulina, insulin receptor

IRS: sustrato del receptor de la insulina, insulin receptor substrate

JNK: quinasa N-terminal de la c-Jun

LCR: líquido cefalorraquídeo

LTP: potenciación sináptica a largo plazo

MAP: proteína asociada a microtúbulos

MARK: quinasa reguladora de la afinidad de microtúbulos

MCI: deterioro cognitivo leve, mild cognitive impairment

MS: separación materna, maternal separation

NMDA: receptor N-metil-D-aspartato

NORT: test de reconocimiento de nuevo objeto

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONF: ovillo neurofibrilar

PHF: filamentos helicoidales pareados

PI3K: fosfoinositol 3 quinasa

PKA: quinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico tipo A

PKC: quinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico tipo C

PS: presenilina

pTau: tau fosforilada

ARNm: ARN mensajero

SAMP8: ratones con tendencia a la senescencia acelerada, senescence accelerated mice prone-8

SAMR1: ratones resistentes a la senescencia acelerada, senescence accelerated mice resistant-1

SNC: Sistema Nervioso Central

Índice



Capítulo I: Introducción	1
1. Enfermedad de Alzheimer	5
1.1. Definición y epidemiología	5
1.2. Factores de riesgo.....	7
1.3. Patogénesis.....	12
1.4. Etiología	14
1.4.1. Hipótesis de la cascada del amiloide.....	15
1.4.2. Hipótesis de la proteína Tau.....	18
1.4.2. Patología sináptica	20
2. Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer	22
2.1. Terapias actuales	23
2.2. Nuevas terapias	24
3. Hipertensión y Enfermedad de Alzheimer	27
4. Modelos animales para el estudio de la Enfermedad de Alzheimer.....	29
4.1. Modelos animales de EA familiar	30
4.1.1. Modelos transgénicos de APP	30
4.1.2. Modelos transgénicos de PS.....	31
4.1.3. Modelos transgénicos de Tau	32
4.1.4. Dobles y triples transgénicos.....	33
4.1.5. Modelos transgénicos 5xFAD APP/PS1	33
4.2. Modelos animales de envejecimiento.....	34
4.3. Modelos animales de EA esporádica	34
4.3.1. Modelos animales genéticos	35
4.3.2. Modelos animales metabólicos.....	35
4.3.3. Modelos animales de estrés.....	36
Bibliografía.....	40

Capítulo II: Planteamiento y Objetivos..... 77

Bibliografía..... 83

**Capítulo III: Propranolol restores cognitive deficits and improves amyloid and
Tau pathologies in a senescence-accelerated mouse model 85**

Resumen 89

Abstract 90

1. Introduction..... 91

2. Material and Methods..... 92

 2.1. Animals 92

 2.2. Drug treatment and experimental design 93

 2.3. Behavioral experiments..... 93

 2.3.1. Locomotor activity..... 93

 2.3.2. Novel object recognition test 93

 2.4. Biochemical measurements 94

 2.4.1. Tissue and blood collection 94

 2.4.2. Western blotting 94

 2.4.3. Insulin levels 96

 2.4.4. A β levels 96

 2.5. Data analysis and statistics 96

3. Results 96

 3.1. Effect of propranolol treatment on memory deficits in SAMP8 96

 3.2. Effects of propranolol on A β processing and clearance 98

 3.3. Effects of propranolol on Tau pathology 99

 3.4. Effects of propranolol on synaptic plasticity 101

4. Discussion 103

References..... 107

Capítulo IV: Propranolol reduces cognitive deficits, amyloid and Tau pathology

in Alzheimer's transgenic mice 115

Resumen	119
Abstract	120
1. Introduction.....	121
2. Material and Methods.....	122
2.1. Animals	122
2.2. Drug treatment and experimental design	123
2.3. Behavioural experiments.....	123
2.3.1. Locomotor activity.....	124
2.3.2. Object recognition.....	124
2.3.2. Fear conditioning test.....	124
2.4. Biochemical measurements	125
2.4.1. Tissue and blood collection	125
2.4.2. Western blotting	125
2.4.3. A β levels	126
2.5. Neuronal primary culture	127
2.6. Data analysis and statistics	127
3. Results	128
3.1. Propranolol restored cognitive function in Tg2576 mice	128
3.2. Propranolol decreases A β burden and protects against A β toxicity	129
3.3. Effects of propranolol on markers of synaptic plasticity	131
3.4. Effects of propranolol on Tau pathology	133
4. Discussion	134
References	139

Capítulo V: Propranolol reduces cognitive deficits, amyloid β levels, Tau phosphorylation and insulin resistance in response to chronic corticosterone

administration	147
Resumen	151
Abstract	152
1. Introduction.....	153
2. Material and Methods.....	154
2.1. Animals	154
2.2. Drug treatment and experimental design	155
2.3. Behavioral tests	155
2.3.1. Locomotor activity.....	155
2.3.2. Cognitive testing: novel object recognition test (NORT).....	156
2.4. Tissue and blood collection	156
2.5. Insulin measurements	156
2.6. Western blotting.....	157
2.7. A β levels.....	158
2.8. Data analysis and statistics.....	158
3. Results	158
3.1. Effects of propranolol on corticosterone-treated mice: cognitive studies	158
3.2. Propranolol decreases A β burden in corticosterone-treated mice.....	160
3.3. Effects of propranolol on corticosterone treatment on insulin and insulin-triggered are reversed by propranolol treatment: implications in Tau pathology	161
4. Discussion	164
4.1. Effects on cognition	164
4.2. Propranolol decreases A β burden, probably through an increased IDE expression.....	165
4.3. Corticosterone treatments lead to alterations in the insulin receptor pathway that are reversed by propranolol.....	165
References.....	168

Capítulo VI: Discusión.....	177
1. Efectos del propranolol sobre los procesos cognitivos	186
2. Efectos del propranolol sobre la patología amiloide.....	186
3. Efectos del propranolol sobre la patología de Tau	188
4. Efectos del propranolol sobre la patología sináptica	190
5. Conclusión general.....	192
Bibliografía	193
Capítulo VII: Conclusiones	207

Capítulo I

Capítulo 1

Introducción

1. Enfermedad de Alzheimer

1.1. Definición y epidemiología

La enfermedad de Alzheimer (EA), la causa más frecuente de demencia en los ancianos, es una patología degenerativa cerebral irreversible, caracterizada por el deterioro gradual de neuronas focalizada principalmente en el hipocampo y la corteza cerebral, cuya causa no es del todo conocida. Desde un punto de vista clínico, la EA se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas. El síntoma inicial más frecuente es una pérdida de memoria a la que se añaden, a medida que avanza la enfermedad, un deterioro en otras capacidades como el lenguaje, el razonamiento y la orientación temporo-espacial, además de cambios en la personalidad y la conducta.

Es una enfermedad con una importante trascendencia económica y social, puesto que cursa con una pérdida gradual de la capacidad del paciente para valerse por sí mismo. Este hecho hace que en las últimas fases de la enfermedad, el paciente dependa totalmente de sus familiares y/o sus cuidadores, que deben enfrentarse diariamente a problemas como la desorientación, la agresividad o su aseo.

Esta patología recibe su nombre del Dr. Alois Alzheimer (1864-1915) (Figura 1), médico alemán que en 1906 describió una nueva enfermedad que producía pérdida de memoria, desorientación, alucinaciones y finalmente la muerte. La enfermedad fue diagnosticada por primera vez en una mujer de 51 años, llamada Auguste D. (1850-1906) (Figura 1) que había ingresado en el Hospital de Frankfurt a causa de un



Fig. 1. A la izda.: Alois Alzheimer (1864-1915). A la drcha: Auguste D. (1850-1906).

cuadro clínico caracterizado por una desorientación, falta de memoria, dificultad para leer y escribir, paranoia y desintegración psicosocial, que por entonces eran los síntomas para la definición legal de demencia. Los síntomas fueron empeorando gradualmente, hasta tener alucinaciones y pérdida de numerosas funciones mentales. En el examen neuropatológico del cerebro de esta mujer se descubrió que su corteza cerebral era más

delgada de lo normal, además de presentar otras anormalidades: placas seniles (estructuras que previamente ya se habían observado en los cerebros de los ancianos) y los llamados ovillos neurofibrilares (ONFs), que fueron descritos por primera vez en la historia. El trabajo se publicó en 1907 con el título "Ueber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde" ("Una enfermedad grave característica de la corteza cerebral"). La denominación del cuadro clínico como enfermedad de Alzheimer fue introducida, en 1910, por Kraepelin en la octava edición de su "Manual de psiquiatría".

A día de hoy la EA es un mal incurable, lo que justifica la necesidad de investigar sobre los procesos patológicos que se producen durante la misma, intentando así, con los conocimientos adquiridos determinar dianas terapéuticas que puedan estimular el desarrollo de nuevos fármacos que constituyan un tratamiento curativo de la EA.

A la luz de los estudios epidemiológicos, parece claro que la edad es el factor de riesgo más importante para sufrir EA (Jorm, 2000). De hecho, la EA es la principal causa de demencia en la población anciana siendo responsable del 50-60% de los casos (Cummings y Cole, 2002; Blennow y col., 2006). Es ampliamente aceptado que existe un aumento exponencial de las cifras de incidencia y prevalencia a medida que se cumplen años (Launer y Hofman, 2000). Su frecuencia se duplica cada 5 años a partir de los 65, de forma que se estima que una de cada 10 personas de más de 65 años de edad y casi la mitad de los mayores de 85 padece EA. Dado el progresivo envejecimiento de nuestra sociedad, tanto en expectativa de años como en número absoluto de personas mayores de 65 años, la EA se está convirtiendo en uno de los grandes problemas sanitarios de la sociedad actual.

Según las últimas estimaciones, un 0,4% de la población mundial (aproximadamente 26,6 millones) y más de 8 millones de europeos sufren la EA. En España, una de cada 4 familias cuenta con algún familiar que sufre demencia tipo Alzheimer, lo que significa que más de medio millón de españoles la padecen. Si la situación actual no cambia, se teme que la incidencia de esta enfermedad aumente progresivamente hasta convertirse en una gran epidemia, sobre todo en los países desarrollados, donde se cree que el número de enfermos se duplicará en 2020, se triplicará en 2030 y se cuadruplicará en 2050 (Brookmeyer y col., 2007).

Actualmente se considera la EA como la tercera enfermedad más costosa detrás de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Se calcula que el coste medio anual por paciente de EA en España es de entre 12000 y 24000 € (Durán, 2000; Atance, 2004), por lo que toda terapia encaminada a ralentizar la progresión puede repercutir significativamente en los costes de la misma.

En la mayoría de los casos se desconocen las causas que producen la EA. Se estima que entre un 1 y un 5% de los casos, la enfermedad se puede considerar que es de origen hereditario (“Enfermedad de Alzheimer familiar” o FAD por sus siglas en inglés), en el que la enfermedad se presenta antes de los 65 años. En estos casos, el factor genético parece ser el principal responsable de la enfermedad. Los casos restantes, en los que la enfermedad aparece después de los 65 años de edad, se consideran “EA esporádica o de aparición tardía”.

En cuanto a la EA familiar, hasta el momento se han identificado 3 mutaciones que la causan: en el cromosoma 21, concretamente en el gen que codifica la proteína precursora del β -amiloide (APP); en el cromosoma 14, en el gen que codifica las presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2); y en el cromosoma 1, en el gen que codifica la PS2. En los 3 casos, las mutaciones tienen como consecuencia un aumento en la producción del péptido A β (ver punto 1.4.1. de la Introducción).

1.2. Factores de riesgo

En la EA esporádica se han descrito múltiples factores de riesgo que a continuación pasan a ser brevemente descritos:

- Edad:

El envejecimiento es, según la OMS, el conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas que aparecen con el paso del tiempo en los seres vivos, y supone, entre otras cosas, una disminución de la capacidad de respuesta a los distintos agentes nocivos que inciden sobre el individuo. Dicho proceso de envejecimiento se caracteriza por una pérdida funcional generalizada que aumenta tanto el riesgo de mortalidad como el de padecer ciertas enfermedades entre las que se encuentran las enfermedades neurodegenerativas,

siendo una de las más frecuentes la EA. Los radicales libres, el genoma y la acumulación de distintas sustancias producidas por el metabolismo celular son, entre otros, distintos factores que se han identificado como posibles responsables del envejecimiento del individuo. En base a estas consideraciones, la edad puede considerarse como el factor de riesgo más importante de la EA, puesto que como se ha comentado en el punto 1.1., la mayor prevalencia de la EA se encuentra en personas mayores de 65 años, edad a partir de la cual el riesgo de padecer la enfermedad se duplica cada 5 años.

- Factores de riesgo genético:

Existe una predisposición genética para sufrir la enfermedad en ciertos genotipos, principalmente el polimorfismo para la apolipoproteína E (ApoE). En concreto, el haplotipo E4 (ApoE4) triplica el riesgo de padecer la enfermedad en el caso de los heterocigotos y lo multiplica por 10 en el caso de los homocigotos, respecto a los haplotipos ApoE2 Y ApoE3 (Huang, 2006; He y col., 2007).

- Factores de riesgo ambiental:

Salvo en el caso de la EA familiar, donde una única causa se relaciona con la aparición de la enfermedad (el componente genético), se podría considerar a la EA como una enfermedad de origen multifactorial, que no se debe a una única causa sino a diversos factores que contribuyen a su aparición y desarrollo.

Enfermedad cardíaca y cerebrovascular:

La enfermedad cardiovascular está asociada a un mayor riesgo de padecer EA, especialmente en personas con aterosclerosis (Newman y col., 2005). El fallo cardíaco y la fibrilación auricular también podrían estar asociados a la demencia. De la misma manera, los infartos cerebrales múltiples y recurrentes se han asociado a déficit cognitivo y a la aparición de EA (Purandare y col., 2006).

Hipertensión

Hay argumentos de índole epidemiológico y experimental que dan base racional a la posible interacción entre la hipertensión y la EA. Además, el tratamiento con

antihipertensivos parece reducir la aparición de deterioro cognitivo y el riesgo de demencia. Este punto va a ser desarrollado en el apartado 3 de la presente Introducción.

Hiperlipidemia:

Diversos estudios sugieren que puede haber factores asociados con el metabolismo lipídico en la génesis o desarrollo del EA (Whitmer y col., 2005). Una cifra de colesterol elevado (> 6,5 mmol/L), asociada o no a hipertensión arterial, hacia los 50 años es factor de riesgo de deterioro cognitivo leve (MCI) hacia los 70 (Kivipelto y col., 2001a). En cuanto a los ácidos grasos, la ingesta moderada o elevada de grasas insaturadas es un factor protector, mientras que la ingesta moderada de grasas saturadas incrementa el riesgo de padecer EA (Kalmijn y col., 1997; Morris y col., 2003), sobre todo en aquellos individuos ApoE4 (Laitinen y col., 2006). Estos ácidos grasos podrían conducir al desarrollo de la enfermedad por diversos mecanismos como la aterosclerosis o la inflamación.

Obesidad y diabetes:

Comienza a demostrarse la relación entre obesidad y diabetes con el deterioro cognitivo y la demencia (Trakas y col., 2001), quizá asociado a la relación que puede existir entre la obesidad y la enfermedad cardiovascular. Un alto índice de masa corporal en la edad adulta se relaciona con un incremento en el riesgo de padecer demencia en la vejez (Kivipelto y col., 2005).

Por otro lado, un gran número de investigaciones han relacionado la demencia (Stewart y Liolitsa, 1999), incluyendo la EA (Biessels y Kappelle, 2005), con la hiperglicemia y la resistencia a la insulina (Steen y col., 2005; De la Monte y col., 2006). Una elevada proporción de afectados por la EA muestran altos niveles de insulina y baja utilización de glucosa, perfil que es característico de una resistencia a la insulina (Craft y col., 1996). Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que el riesgo de desarrollar EA es mayor entre los pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 (DM2) (Leibson y col., 1997; Ott y col., 1999; Luchsinger y col., 2001; Arvanitakis y col., 2004; Biessels y Kappelle, 2005), por lo que pudiera sugerirse que la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina pueden ser un factor de riesgo para el desarrollo de la EA.

Estrés:

Hay cada vez más estudios que demuestran una posible relación entre el estrés y los glucocorticoides (GC, sistema efector de la respuesta al estrés en el organismo), con un aumento en el riesgo para padecer EA. La implicación de los GC en los procesos de aprendizaje y memoria está ampliamente aceptada. El estrés y los GC tienen un gran impacto sobre la ejecución cognitiva. El papel de los GC en el SNC puede ser tanto neuroprotector como neurodegenerativo, dependiendo de la concentración de los mismos (Abraham y col., 2001). Niveles basales normales de GC son necesarios para la consolidación de la memoria a largo plazo y los aumentos puntuales en la secreción de los GC durante el aprendizaje refuerzan la memoria espacial (Brinks y col., 2007; Sandi y Pinelo-Nava, 2007). En cambio, la exposición crónica a niveles altos de GC produce alteraciones que eventualmente generan disfunción, atrofia y muerte neuronal en el hipocampo. Como consecuencia, se provoca una reducción del aprendizaje espacial y la memoria, tareas que dependen en parte del buen funcionamiento del hipocampo (De Kloet y col., 1999; Roozendaal y col., 2003).

Se ha encontrado un aumento en la EA de los niveles de cortisol en sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) y saliva (Martignoni y col., 1990; Hartmann y col., 1997; Weiner y col., 1997; Hatfield y col., 2004; Elgh y col., 2006; Hoogendijk y col., 2006; Popp y col., 2009; Gil-Bea y col., 2010). De hecho, se ha sugerido que los niveles elevados de cortisol y el estrés podrían contribuir al desarrollo y mantenimiento de la enfermedad. Esta hipótesis ha sido apoyada por estudios que demuestran que situaciones de estrés o niveles elevados de GC exacerbaban la sintomatología en los modelos transgénicos de EA (Green y col., 2006; Jeong y col., 2006). Por todo ello, se ha sugerido que los niveles de cortisol en enfermos de EA podrían tener relevancia pronóstica. En relación con este hecho, Csernansky y col. (2006) demostraron que niveles elevados de cortisol en sangre durante la fase clínica de pre-demencia predice un deterioro cognitivo más rápido. Por otro lado, se han observado niveles elevados de cortisol en LCR en pacientes con EA pero no en personas con MCI, lo que sugiere que el aumento de esta hormona en LCR se relaciona con la progresión de la enfermedad (Popp y col., 2009).

Depresión:

Además de que la depresión puede ser síntoma prodrómico de la EA, parece existir una asociación positiva entre historia de depresión y posterior desarrollo de EA (Jorm, 2000). Estudios epidemiológicos señalan que los pacientes afectados por la EA tienen una alta prevalencia de depresión siendo ésta entre el 10 y el 50% (Butters y col., 2008). Dado que los síntomas depresivos de relevancia clínica se encuentran aproximadamente en un 20% de los pacientes enfermos de EA (Reifler y col. 1982; Patterson y col., 1990; Starkstein y col., 1997), se sugiere que ambas enfermedades puedan compartir algunos mecanismos patofisiológicos.

También existen estudios que indican que tener historia previa de depresión puede doblar o hasta cuadruplicar el riesgo de desarrollar demencia de tipo Alzheimer (Zalsman y col., 2000; Pfenning y col., 2007). Además, pacientes deprimidos con MCI presentan un mayor riesgo de desarrollar EA que sujetos no deprimidos únicamente con MCI (Modrego y Fernandez, 2004). También existen estudios mostrando que los enfermos de EA con antecedentes de depresión muestran un aumento de algunos marcadores neuropatológicos de la EA (Rapp y col., 2006). Por otro lado, a pesar de que en la depresión no se ha observado una elevada pérdida neuronal, varios estudios han mostrado un incremento en los marcadores pro-apoptóticos, una disminución en los marcadores anti-apoptóticos y alteraciones en los niveles de BDNF en pacientes con depresión (Chen y col., 2001) y en modelos experimentales de depresión (Luo y col., 2004; Bachis y col., 2008).

- Inflamación:

Mientras que en cerebros de personas de avanzada edad sin patología se pueden encontrar ligeros signos de neuroinflamación, en aquellos con EA este factor aparece con mucha mayor intensidad, observándose una significativa activación de la microglía. Existen evidencias de que el péptido A β , principal componente de las placas seniles, puede activar la microglía (Paresce y col., 1996; Yan y col., 1998). Además, diversos estudios han observado la activación de astrocitos y de la microglía sin presencia de placas seniles tanto en modelos animales de EA (Heneka y col., 2005) como en humanos (Cagnin y col., 2001),

demostrando la importancia, al menos al comienzo de la enfermedad, de los oligómeros de A β en la activación de la glía.

- Otros factores:

Otros factores importantes en la EA son el sexo, ya que se aprecia un riesgo mayor de padecer la enfermedad en las mujeres (en proporción aproximada de 3 a 1), en particular entre la población mayor de 85 años (Di Carlo y col., 2002; Schmidt y col., 2008), el tabaquismo, la intoxicación crónica por ciertos metales como el cobre, el nivel de educación, los traumatismos craneoencefálicos graves, etc.

1.3. Patogénesis

Macroscópicamente, cerebros *post-mortem* de EA revelan una profunda atrofia cerebral que afecta, principalmente, a áreas cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria como las cortezas temporal, parietal y frontal, el hipocampo y la amígdala (Figura 2).



Fig. 2. Características macroscópicas de la EA, atrofia cerebral. Ilustración de Bob Morreale adaptada al castellano (American Health Assistance Foundation www.ahaf.org/alzheimers).

La reducción en el volumen cerebral se debe, principalmente, a una importante degeneración neuronal y sináptica (Mattson, 2004).

Histopatológicamente, los cerebros de pacientes de EA muestran dos estructuras patológicas características: las placas seniles extracelulares y los ONFs intracelulares (Figura 3). Placas y ovillos son estructuras proteicas anormales que se depositan en la corteza y el hipocampo a medida que aparece la neurodegeneración

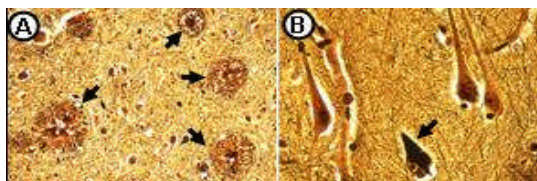


Fig. 3. Principales marcadores histopatológicos de la EA.
A) Placas seniles B) Ovillos neurofibrilares

asociada a la EA, y son la base del diagnóstico definitivo de la enfermedad (Small y col., 1997; Selkoe, 2004).

Placas seniles

Las placas seniles son depósitos extracelulares compuestos principalmente por el péptido beta amiloide (A β). Este péptido procede del procesamiento amiloidogénico de la proteína precursora de amiloide (APP, ver punto 1.4. de la presente Introducción) tras la acción de las enzimas β -secretasa y γ -secretasa, y forma agregados insolubles que se acumulan y depositan.

Ovillos neurofibrilares

Los ONFs son acúmulos filamentosos intracelulares de proteína Tau en estado hiperfosforilado. La proteína Tau forma parte de una familia de proteínas asociadas a microtúbulos (microtubule-associated proteins, MAPs) y cuando esta proteína se hiperfosforila (pTau) adopta conformaciones anómalas y se acumula (Goedert y col., 1991).

En los cerebros de los pacientes con EA, las placas seniles y los ONFs no están distribuidos al azar sino que siguen unos patrones bien establecidos. Atendiendo a un orden temporal, una de las primeras características histopatológicas que se desarrolla en los cerebros con EA es la aparición de ONFs en un grupo de neuronas localizadas en la porción medial del lóbulo temporal, concretamente en la corteza entorrinal y en la formación hipocampal, viéndose afectadas las funciones de aprendizaje y memoria. A medida que la enfermedad avanza, la presencia de los ONFs se extiende a áreas asociativas y estructuras subcorticales, lo que conduce a una acentuación del deterioro cognitivo del paciente, mientras que las áreas motoras tienden a permanecer libres de éstos hasta los estadios más avanzados. Curiosamente, la distribución de las placas seniles es más aleatoria, ya que, aunque también se localizan en áreas asociativas, su densidad es relativamente menor en regiones clínicamente relevantes como el hipocampo (Braak y Braak, 1995) mientras que pueden ser muy abundantes en regiones clínicamente silentes (Arnold y col., 1991). Por tanto, se puede considerar que, en general, la distribución de los ONFs se correlaciona mejor que la de placas seniles con las alteraciones clínicas características de esta demencia (Arriagada y col., 1992).

Otro factor característico en esta enfermedad, además de los dos rasgos descritos, es la pérdida significativa de neuronas y sinapsis en áreas vulnerables tales como regiones límbicas y corticales (Scheff y Price, 2006), lo que contribuye a la aparición de los síntomas clínicos debido a la desconexión de las neuronas entre las distintas áreas cerebrales (Terry y col., 1981). Al igual que en el caso de los ONFs, la pérdida neuronal y sináptica se correlaciona de forma muy precisa con la evolución de las alteraciones clínicas observadas en la EA (Matsui y col., 2006). La posible relación entre la muerte neuronal y los ONFs merece ser comentada. Diferentes grupos de investigación han puesto de manifiesto que en el hipocampo, la estructura cerebral más afectada en la EA, existe una correlación entre el número de ONFs y el número de neuronas dañadas, postulando que la acumulación de pTau en el interior de la neurona induce la formación de ONFs, lo que provocaría un fallo global en el funcionamiento celular y posterior muerte neuronal (Braak y col., 1994). La lisis celular sería por tanto la responsable de la liberación de los ovillos en el espacio extracelular (Smith, 2002). En este sentido, se puede admitir que el número y la distribución de estos ovillos se correlacionan tanto con el grado de pérdida de neuronas y sinapsis como con el deterioro cognitivo en los pacientes.

Otras características de la EA son el aumento del estrés oxidativo a nivel cerebral, los fenómenos de inflamación o las alteraciones en los procesos de expresión génica (Cummings y Cole, 2002). Todas ellas son, sin embargo, procesos comunes en diferentes enfermedades neurodegenerativas.

1.4. Etiología

Pese a todo el conocimiento de algunos de los factores de riesgo asociados al desarrollo de la EA (ver punto 1.2. de la presente Introducción), las causas de la enfermedad no han sido completamente esclarecidas. Existen dos teorías principales que intentan dar explicación al desarrollo de la enfermedad. La principal de todas ellas es la “hipótesis de la cascada del amiloide”, que postula que el evento inicial que lleva finalmente a la neurodegeneración y a la demencia, es el desequilibrio entre la producción y el aclaramiento del péptido A β (Hardy y Selkoe, 2002; Meilandt y col., 2009; Crews y Masliah, 2010). Por otro lado, existe la teoría de que la hiperfosforilación de Tau y la

degeneración neurofibrilar es la responsable de los trastornos cognitivos que se producen en la EA (Iqbal y col., 2009). La patología sináptica también ha sido implicada en la génesis de la EA.

1.4.1. Hipótesis de la cascada del amiloide

Como acaba de ser mencionado, una de las hipótesis que intentan explicar las causas de la EA es la hipótesis de la cascada amiloide, que postula que en la EA se produce un desequilibrio entre la producción y el aclaramiento del péptido A β .

El A β es producido por el corte de la proteína precursora del amiloide (APP). La APP es una proteína transmembrana muy ubicua a nivel celular que posee una porción intracelular pequeña que contiene el extremo carboxilo terminal, una región transmembrana y una porción extracelular relativamente larga (Figueiredo-Pereira y col., 1999). Durante su procesamiento se libera A β directamente al espacio extracelular o al intracelular que después puede ser secretado al exterior. El procesamiento de la APP puede seguir dos vías metabólicas: la no amiloidogénica y la amiloidogénica (Figura 4).

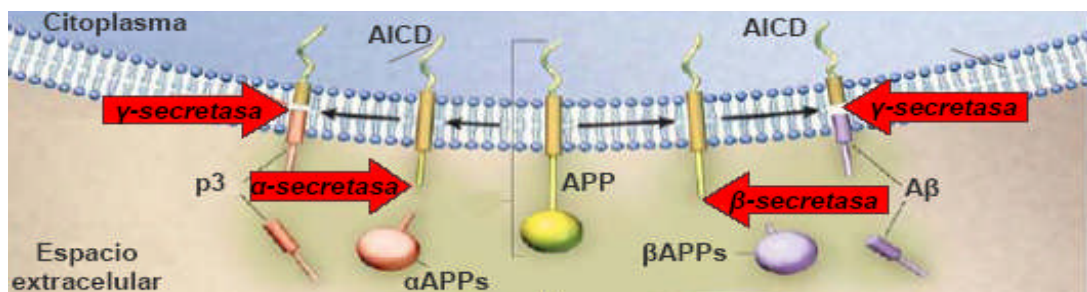


Fig. 4. Procesamiento de la APP. Procesamiento no amiloidogénico (a la izda): la enzima α -secretasa corta la porción intermedia de la región del péptido A β , dando origen a una proteína larga que es excretada al medio extracelular (α APPs), y un péptido de 83 aminoácidos (C83). Este es procesado por la γ -secretasa produciendo el péptido p3 y el fragmento C-terminal del APP (AICD). Procesamiento amiloidogénico (a la derecha): la β -secretasa (BACE1) realiza un corte en el extremo amino terminal de la región del péptido A β , generando un fragmento distal (β APPs), y un péptido de 99 aminoácidos (C99). Este fragmento sufre un nuevo corte por la γ -secretasa, generándose el AICD y el péptido A β . (Adaptado de Cummings, 2004).

En condiciones no patológicas se produce principalmente el **procesamiento no amiloidogénico** de la APP, donde la enzima α -secretasa corta la porción intermedia

correspondiente a la región del péptido A β , concretamente en la Lys16, dando origen a una proteína larga que se compone de prácticamente toda la región extracelular de la APP y que es excretada al medio extracelular nada más ser cortada (α APPs), y un péptido de 83 aminoácidos denominado C83 (Yamazaki y col., 1996). Este último es procesado posteriormente por acción de la γ -secretasa produciendo un péptido conocido como p3 y el fragmento C-terminal de la proteína precursora del amiloide (AICD, amyloid precursor protein intracellular domain) (Lammich y col., 1999). Se ha descrito que tanto el fragmento α APPs como el C83 poseen efectos beneficiosos en cultivos neuronales que se asocian a la supervivencia celular, interacción célula-matriz intersticial, crecimiento neurítico, formación sináptica y plasticidad neuronal (Shivers y col., 1988; Jin y col., 1994; Perez y col., 1997; Meziane y col., 1998).

Una pequeña proporción de la APP sufre un **procesamiento amiloidogénico**, dando lugar al péptido A β . BACE1 realiza un corte en el extremo amino terminal de la región del péptido A β (Sinha y col., 1999; Vassar y col., 1999; Yang y col., 1999), generando dos fragmentos: uno distal, que segrega al medio extracelular, conocido como β APPs, y un péptido de 99 aminoácidos unido a la membrana denominado C99, que contiene todo el péptido A β y el extremo carboxilo de la APP. Este fragmento es internalizado rápidamente hasta el compartimento lisosomal donde sufre una nueva digestión proteolítica por la γ -secretasa, generándose un péptido de 55-57 aminoácidos (AICD) y el péptido A β (Figueiredo-Pereira y col., 1999), que puede variar entre 38 y 43 aminoácidos (Younkin, 1998; Selkoe, 2001a; Selkoe, 2001b). En humanos, la especie mayoritaria de A β es aquella que contiene 40 aminoácidos (A β_{40}) pero, aunque de manera minoritaria (10-15%), la γ -secretasa produce también péptidos de 42 aminoácidos (A β_{42}). En cambio, en determinadas líneas de modelos animales de EA, la forma que se produce mayoritariamente es la de 42 aminoácidos (Sabbagh y col., 2008). Se ha descrito que la relación entre la forma de 42 aminoácidos y la de 40 puede ser importante en la etiología de la enfermedad (Mayeux, 2003; Wiltfang y col., 2007).

La hipótesis de la cascada amiloide se sustenta en el componente genético de la EA, puesto que se ha visto que las mutaciones que presentan los pacientes que padecen EA familiar, ya sea a nivel de la APP o de las presenilinas (proteínas que forman parte del

complejo γ -secretasa), conducen a una mayor producción del péptido $A\beta$ de 42 aminoácidos. Además, es conocido que las personas con síndrome de Down, donde el gen para la APP se encuentra duplicado, desarrollan placas de amiloide a una edad muy precoz. También se ha observado en pacientes con EA familiar una duplicación en el locus de la APP (Rovelet-Lecrux y col., 2006).

Pese a que no existe uniformidad de criterios sobre la importancia de los fragmentos derivados de la APP en la patología de la EA, sí se puede afirmar que el procesamiento amiloidogénico inicia una cascada de alteraciones moleculares que provoca la patología neurodegenerativa. La acumulación de este péptido a nivel cerebral (Selkoe, 1997; Sheng y col., 2002), desencadenaría fenómenos como la formación de ONFs, exotoxicidad glutamatérgica, estrés oxidativo, inflamación y activación de la apoptosis celular (Hardy y Selkoe, 2002) (Figura 5).

Inicialmente se pensó que el $A\beta$ se producía sólo en personas con EA, pero más tarde se comprobó que el $A\beta$ se produce constitutivamente durante el metabolismo celular normal (Haass y col., 1992). En ambos casos, el $A\beta$ acumulado sufriría un cambio de conformación que facilitarían su agregación en oligómeros solubles y, posteriormente, en fibras insolubles que se depositarían en forma de placas. Por ello, en el caso de la EA de tipo esporádico la hipótesis estudiada defiende que la acumulación de $A\beta$ se debe al déficit en la capacidad de aclaramiento del mismo que presentan los pacientes (Hama y Saido, 2005) y no a un aumento en su producción. De hecho, diversos estudios han puesto de manifiesto que en cerebros de pacientes afectados de EA se produce una alteración significativa de los mecanismos encargados de la limpieza

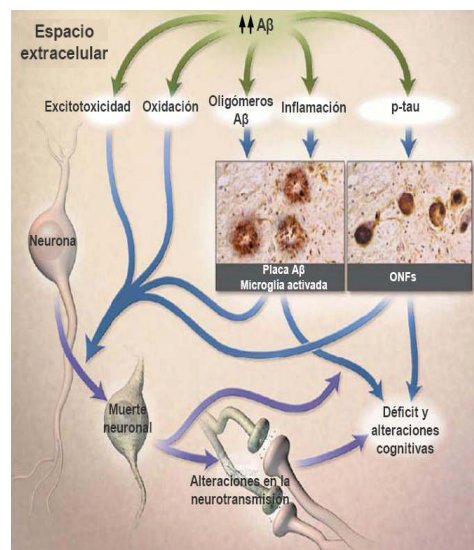


Fig. 5. Hipótesis de la cascada amiloide.

Según esta hipótesis se produce un desequilibrio entre la producción y el aclaramiento del péptido $A\beta$, de forma que ese $A\beta$ se acumula a nivel cerebral, desencadenando la formación de ONFs, inflamación, excitotoxicidad glutamatérgica, estrés oxidativo y activación de la apoptosis celular. (Adaptado de Cummings, 2004).

Por ello, en el caso de la EA de tipo esporádico la hipótesis estudiada defiende que la acumulación de $A\beta$ se debe al déficit en la capacidad de aclaramiento del mismo que presentan los pacientes (Hama y Saido, 2005) y no a un aumento en su producción. De hecho, diversos estudios han puesto de manifiesto que en cerebros de pacientes afectados de EA se produce una alteración significativa de los mecanismos encargados de la limpieza

de proteínas anómalas tales como el péptido A β y la proteína Tau (Selkoe, 2000). Los mecanismos implicados en la eliminación del péptido A β han sido estudiados exhaustivamente, encontrándose diversas vías implicadas, entre las que se encuentra la degradación enzimática.

Las principales enzimas con actividad endopeptidasa implicadas en la degradación del péptido A β se caracterizan por ser metaloproteasas dependientes de zinc, entre las que se encuentra la enzima degradadora de insulina (IDE o insulinasina). La enzima IDE actúa extracelularmente y se encuentra presente además de en cerebro, en hígado, riñón y músculo (Authier y col., 1996). El IDE juega un papel crucial en el aclaramiento cerebral del A β (Kurochkin y Goto, 1994; McDermott y Gibson, 1997; Qiu y col., 1998) ya que, aunque el sustrato principal de esta metaloproteasa es la insulina, IDE también se encarga de degradar el péptido A β , impidiendo así que se acumule, retrasando la formación de placas seniles y por lo tanto, protegiendo de la EA. Estudios histopatológicos han demostrado que en cerebros de pacientes de EA hay una menor expresión de este enzima. Pero la evidencia más consistente acerca del papel de IDE en el procesamiento de A β se deriva de estudios realizados en ratones *knockout*. Estos ratones deficientes en IDE presentan elevados niveles de A β en el cerebro. Además, se ha observado que ratones heterocigóticos IDE $-/+$ presentan niveles de A β intermedios entre los hallados en animales no transgénicos y los encontrados en animales homocigóticos IDE $-/-$ (Farris y col., 2003).

Teniendo en cuenta todo esto, el IDE podría ser una importante diana terapéutica para el tratamiento de la EA, ya sea sobreexpresándolo mediante terapia génica, o aumentando su expresión/activación.

1.4.2. Hipótesis de la proteína Tau

La proteína Tau se expresa de manera muy abundante en los axones de las neuronas. Está localizada en el citosol neuronal donde se une a la tubulina, entre otras proteínas, formando los microtúbulos de transporte celular. Este hecho le confiere un papel fundamental, participando de este modo en la formación y mantenimiento de dendritas, axones y, en general, de la estructura neuronal (Weingarten y col., 1975; Drubin y Kirschner, 1986; Caceres y Kosik, 1990).

Su función queda regulada por su grado de fosforilación, por lo que al estar hiperfosforilada en la EA es incapaz de llevar a cabo su papel fisiológico, produciéndose un colapso del sistema de transporte que conduce al mal funcionamiento de la comunicación intercelular y a la muerte neuronal. Esta observación apoya la hipótesis de la proteína Tau, la cual defiende que es esta proteína la que da inicio a la cascada de trastornos en la EA (Mudher y Lovestone, 2002). De acuerdo a este modelo, la hiperfosforilación de Tau aumenta su adherencia, lo que explica su tendencia a agregarse en forma de filamentos helicoidales pareados (paired helical filaments, PHF) (Morishima-Kawashima y col., 1995), que son capaces de enlazarse helicoidalmente formando, eventualmente, los ONFs (Goedert y col., 1991). Cuando esto ocurre, los microtúbulos se desintegran colapsando el sistema de transporte de la neurona (Figura 6).

La proteína Tau puede ser fosforilada en aproximadamente 79 residuos de serina/treonina (Goedert y col., 1989). En la EA, al menos 30 de estos residuos se encuentran fosforilados (Gong y col., 2005) por dos tipos diferentes de quinastas: las dirigidas a prolina, como la quinasa 3β de la glicógeno sintasa (GSK3 β), la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), p38 y la quinasa N-terminal de la c-Jun (JNK), así como por las no dirigidas a prolina como la quinasa reguladora de la afinidad a microtúbulos (MARK), la quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina tipo 2 (CaMKII) y la quinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico tipo A y C (PKA y PKC, respectivamente) (Morishima-Kawashima y col., 1995; Gong y col., 2005; revisado por Ávila, 2006).

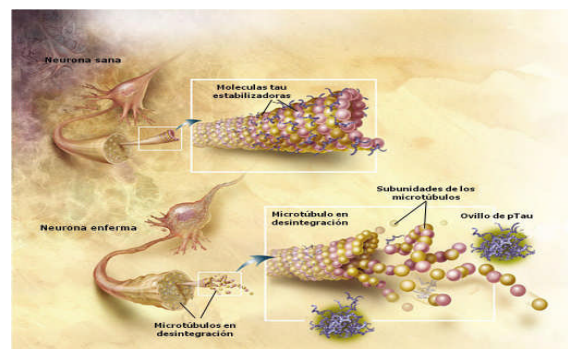


Fig. 6. Alteración de los microtúbulos derivada de la fosforilación de la proteína Tau. Cuando Tau se hiperfosforila los microtúbulos se desintegran colapsando el sistema de transporte de la neurona. La hiperfosforilación aumenta su adherencia, lo que explica su tendencia a agregarse en forma de filamentos helicoidales pareados, que son capaces de enlazarse helicoidalmente formando los ONFs. (Adaptado de Querfurth y LaFerla, 2010).

Parece ser que estas fosforilaciones a menudo regulan el grado de unión de Tau a los microtúbulos (Busciglio y col., 1995). Además, pTau parece ser más resistente a la

proteólisis por diferentes proteasas, lo que contribuiría a la acumulación de ésta en las neuronas con el consiguiente efecto tóxico (Shimura y col., 2004).

Finalmente, cabe destacar una idea propuesta en los últimos años que sugiere que la acumulación de A β puede provocar la fosforilación de Tau y, aunque ambos contribuyen a la fisiopatología de la enfermedad, esta última es quien principalmente produce el deterioro de estructuras y de las funciones neuronales. De hecho, se ha observado que cantidades elevadas de A β aumentan la formación de lesiones por Tau fibrilar en modelos animales de EA (Lewis y col., 2001; Oddo y col., 2003), apoyando la hipótesis de que las patologías amiloide y Tau aparecen cronológicamente en este orden. No obstante, el nexo entre A β y la patología Tau sigue sin estar totalmente esclarecido.

1.4.3. Patología sináptica

Como ha sido comentado, la pérdida de sinapsis, junto con la presencia de ONFs, es la característica fisiopatológica de la EA que mejor se correlaciona con el grado de déficit cognitivo (Terry, 2000). La degeneración sináptica que se produce en la EA se caracteriza por una pérdida progresiva de terminales axónicas (Scheff y col., 2007), una disminución en la expresión de proteínas pre y postsinápticas (Almeida y col., 2005), alteraciones en la estructura de espinas dendríticas (Knobloch y Mansuy, 2008) e incluso, la pérdida de las mismas (Blanpied y Ehlers, 2004). Además de la gran pérdida sináptica, también se observan cambios compensatorios en las terminales restantes (DeKosky y Scheff, 1990; Scheff y col., 1993; Scheff y Price 1993).

A pesar de que no están claros los mecanismos patológicos que conducen al daño sináptico en la EA, además de la relación existente entre la aparición de ONFs y el daño neuronal (ver punto 1.2.), el A β parece jugar un papel clave. La acumulación del péptido A β intraneuronal parece ser uno de los principales responsables de la disfunción sináptica que se produce en la EA, y que se correlaciona con el déficit en los fenómenos de aprendizaje y memoria que se observan en diferentes modelos animales de la EA. Por ejemplo, los ratones transgénicos para APP han proporcionado evidencias de que la disfunción sináptica relacionada con A β puede ocasionar déficits en el aprendizaje y la memoria (Westerman y col., 2002). Existen pruebas claras de los efectos directos de A β en mecanismos de

plasticidad sináptica demostrando que la actividad neuronal puede inducir el procesamiento de la APP para generar A β y que el péptido A β a su vez puede reducir la transmisión sináptica excitatoria. Diferentes investigaciones han revelado que las formas solubles del mismo son capaces de deprimir la transmisión sináptica a través de mecanismos similares a la depresión a largo plazo, induciendo la fosforilación de los receptores glutamatérgicos tipo AMPA y su endocitosis (Hsieh y col., 2006).

A continuación se describen dos de los marcadores de plasticidad sináptica que más consistentemente han sido relacionados con la patología de EA:

Sinaptofisina

La liberación de neurotransmisores es un proceso altamente regulado y que comprende varios pasos: la dirección de las vesículas sinápticas a las zonas presinápticas activas, el anclaje de las vesículas a la membrana celular, la fusión entre la membrana vesicular y la plasmática y el reciclaje de la membrana vesicular (Sudhof, 2000). En ese proceso participan las proteínas de las membranas vesiculares (De Camilli y Jahn, 1990), de entre las cuales una de las más abundantes es la sinaptofisina (Rehm y col., 1986). La sinaptofisina fue la primera proteína de vesícula sináptica clonada y desde su descubrimiento en 1985 (Wiedenmann y Franke, 1985), muchos laboratorios la han usado como un marcador de neuroplasticidad que permite estudiar la distribución y el número de las sinapsis y/o la integridad general de la expresión de proteínas sinápticas. No se conoce su papel exacto en todo ese proceso de exocitosis de los neurotransmisores, pero se ha visto que es fundamental para el control de la liberación de estas sustancias, y como consecuencia también para procesos como la LTP, el aprendizaje y la memoria, ya que se ha visto que ratones *knockout* para esta proteína, presentan una fuerte disminución en los procesos de plasticidad sináptica (Spiwoks-Becker y col., 2001; Valtorta y col., 2004).

Diversos estudios han demostrado una pérdida de la proteína sinaptofisina en cerebros de EA (Wakabayashi y col., 1994; Love y col., 2006). Según lo observado, esta pérdida ocurre inicialmente en el giro dentado del hipocampo y se extiende a la corteza frontal a medida que la enfermedad se hace más severa (Masliah y col., 1992).

BDNF

Las neurotrofinas son moléculas que promueven el desarrollo y la supervivencia de las neuronas (Bibel y Barde, 2000). De entre todas las neurotrofinas, el BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) destaca como regulador de la plasticidad sináptica, la supervivencia y diferenciación neuronal y también como diana clave para el desarrollo de nuevos tratamientos para desórdenes neuronales (Binder y Scharfman, 2004). Se ha descrito que el BDNF parece ser fundamental para la supervivencia continua y el mantenimiento del fenotipo de neurona madura, de manera que se estima que los cambios en los niveles y la distribución podrían ser importantes en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas.

Teniendo en cuenta que el BDNF regula la potenciación sináptica a largo plazo (LTP) y otras formas de plasticidad (procesos que tienen un papel clave en la formación y el almacenamiento de memoria y están afectados en la EA), una reducción en los niveles endógenos de esta neurotrofina podría subyacer a la patofisiología de la EA.

Los primeros estudios que hablan de la deficiencia de BDNF en la EA datan de los años 90, en los cuales se demostró una disminución selectiva de la expresión de ARNm en el hipocampo de los pacientes con EA (Phillips y col., 1991). Estudios posteriores mostraron también disminuciones de esta expresión en el neocórtex y el núcleo basal de Meynert, fuente principal de inervación colinérgica de la corteza cerebral (Murer y col., 1999; Murer y col., 2001; Tapia-Arancibia y col., 2008). Más tarde se pudo comprobar que no solo el ARNm, sino también los niveles de proteína tanto madura como inmadura (proBDNF) disminuían cuando se medían en el giro dentado, la corteza frontal o la corteza parietal de enfermos de EA (Narisawa-Saito y col., 1996; Lee y col., 2005; Peng y col., 2005).

2. Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer

Los tratamientos disponibles actualmente para la EA son tratamientos sintomáticos. Estos tratamientos tienen como objetivo la mejora de la cognición pero no actúan sobre la etiología de la enfermedad. Sin embargo, dadas las importantes repercusiones humanas,

sociales y económicas de la enfermedad, es evidente la necesidad de buscar nuevos tratamientos curativos.

2.1. Terapias actuales

Los fármacos que en la actualidad se emplean para el tratamiento sintomático de la EA son:

Inhibidores de la acetilcolinesterasa

En la actualidad se utilizan tres: donezepilo, rivastigmina y galantamina. Se ha postulado que la degeneración de las neuronas colinérgicas, sobre todo en el prosencéfalo basal, causa una disminución de los niveles de acetilcolina en las terminales presinápticas de hipocampo y neocortex, lo que produciría alteraciones en la memoria (Terry y Buccafusco, 2003). Los fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa aumentan la disponibilidad de acetilcolina en la hendidura sináptica al inhibir la enzima encargada de su degradación.

Memantina

Es un antagonista débil y no competitivo del receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA). En la EA, alteraciones de la actividad glutamatérgica produce un aumento de los receptores de NMDA, lo que lleva a una disfunción neuronal. La memantina bloquea los canales NMDA de manera que modula los efectos patológicos de los niveles elevados de glutamato pero permitiendo al receptor activarse ante señales fisiológicas normales.

Fármacos para el tratamiento de alteraciones conductuales

Además de las características típicas de la EA, la sintomatología cognitiva viene acompañada por otras alteraciones conductuales, como pueden ser la agresión, agitación psicomotora, depresión, ansiedad, insomnio ó psicosis (alucinaciones y delirios). Por tanto, es frecuente que estos pacientes reciban ansiolíticos, hipnóticos, neurolépticos y/o antidepresivos.

Hay que señalar que ninguno de los actuales fármacos detiene la degeneración de las neuronas o revierte la progresión de la enfermedad. Actualmente todos los esfuerzos en la investigación de nuevos fármacos se basan en las distintas hipótesis sobre la etiología de la enfermedad que han sido postuladas, como por ejemplo la deposición de placas de amiloide, la formación de ONFs y la neuroinflamación.

2.2. Nuevas terapias

En los últimos años se ha sugerido la posible utilidad de diferentes grupos de fármacos en el tratamiento de la EA, por lo que se están realizando cada vez más estudios que se encuentran en diferentes fases de desarrollo (Tabla 1).

Tabla 1. Fases del desarrollo de terapias actuales para la EA (Adaptado de Haas, 2012)

Mecanismo de acción	Nº fármacos	Fase clínica
Inhibidores de β -secretasa	3	I, II, III
Inhibidores de γ -secretasa	7	I, II, III
Moduladores de γ -secretasa	3	I, II, III
Potenciadores de α -secretasa	12	I, II
Fármacos que actúan sobre receptores serotoninérgicos	5	I, II
Fármacos que afectan a la acetilcolina	4	II
Inhibidores de la agregación de $A\beta$	10	I, II
Inmunoterapia contra $A\beta$	11	I, II, III
Inhibidores de fosforilación de Tau	3	II, III
Potenciadores de la desfosforilación de Tau	3	I, II
Inhibidores de agregación de Tau/degradadores de ovillos	3	II, III
Anti-inflamatorios/Neuroprotectores	9	II, III
Suplementos nutricionales	10	II, III, IV
Antagonistas de receptores de histamina	3	I, II
Antagonistas de receptores adrenérgicos	1	II

Algunas de las terapias farmacológicas potencialmente útiles para el tratamiento de la EA son:

Moduladores de las secretasas

Se observó que ratones *knockout* de BACE1 no producen A β ni desarrollan un fenotipo clínico (Luo y col., 2001). Además, los inhibidores de la β -secretasa disminuyen los niveles cerebrales de A β , lo que podría reducir la patología (Chang y col., 2004). Sobre los inhibidores de la γ -secretasa hay dudas debido a los efectos adversos ya que también actúan sobre otros sustratos como Notch (Wolfe, 2008). Sin embargo, los nuevos inhibidores generados han demostrado no afectar a la señalización de Notch (Petit y col., 2001), así como buena tolerancia en ensayos clínicos en fase I (Siemers y col., 2005).

Inmunoterapia contra el péptido A β

La primera vez que se informó de esta posible terapia se demostró que la inmunización activa con A β fibrilar en un modelo animal de EA disminuía la agregación del péptido (Schenk y col., 1999). Los efectos pueden estar mediados por anticuerpos que reconocen A β y que pueden unirse bien al péptido presente en placas, lo que induciría la limpieza de dicho A β a través de la microglía (Schenk y col., 2004), o bien a formas solubles del péptido, promoviendo la eliminación al exterior del cerebro.

Fármacos inhibidores de la fosforilación de Tau

Los candidatos que reducen la fosforilación de Tau al inhibir quinasas tales como Cdk5 y GSK3 β , están en distintas fases de ensayos clínicos. Sin embargo, ya que esta fosforilación depende de múltiples quinasas y fosfatasas (Avila, 2006), la inhibición de una única quinasa podría no ser suficiente para normalizar la fosforilación de Tau.

Por otro lado, los resultados de diversos estudios epidemiológicos sugieren la posible utilidad de otros fármacos que actúan sobre diversos factores de riesgo ambientales en el tratamiento de la EA:

Fármacos anti-inflamatorios

Como ya ha sido mencionado, la EA tiene un fuerte componente inflamatorio (McGeer y McGeer, 2007). Diversos estudios epidemiológicos han relacionado el uso de

fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) con un menor riesgo de desarrollar EA (Aisen, 2002).

Fármacos que disminuyen el colesterol

En un estudio de Sparks y col. de 1994, se observó que ratones alimentados con una dieta muy alta en colesterol desarrollaban acumulaciones intracelulares de A β . Sin embargo, a día de hoy estudios epidemiológicos no han podido concretar si el empleo de fármacos que disminuyen el colesterol, más concretamente las estatinas, son capaces de modificar los niveles de dicho péptido, así como de mejorar el estado cognitivo de los pacientes (Hoglund y col., 2005; Sparks y col., 2005). Esto ha llevado a la realización de estudios más amplios que se encuentran en desarrollo actualmente.

Fármacos antihipertensivos

Este punto se desarrolla en el apartado 3. de la Introducción.

Estrógenos

Estudios epidemiológicos han relacionado la suplementación postmenopáusica con estrógenos con un descenso en el riesgo de desarrollar EA (Tang y col., 1996). Estudios en animales también sugieren que los estrógenos podrían tener diversos efectos beneficiosos sobre la función neuronal (Almeida y Flicker, 2005). Sin embargo, ensayos clínicos no demuestran un menor riesgo de padecer la enfermedad (Shumaker y col., 2004).

Antioxidantes

Estudios basados en la ingesta de dietas ricas en antioxidantes, como la vitamina E, demostraron que éstos disminuían el riesgo de padecer EA (Engelhart y col., 2002). Sin embargo, otros ensayos clínicos randomizados no han demostrado ningún efecto de la vitamina E sobre la progresión de la enfermedad (Petersen y col., 2005).

3. Hipertensión y Enfermedad de Alzheimer

Cada vez se acumulan más evidencias acerca de la asociación entre las cifras elevadas de presión arterial en la edad media de la vida y la aparición de la EA en las edades más avanzadas (Kivipelto y col., 2001b).

La hipertensión produce desmielinización isquémica (Tuhim y Levine, 2002), pérdida neuronal hipocampal (Kril y col., 2002), así como una disminución de la integridad vascular de la barrera hemato-encefálica (BHE), dando como resultado una extravasación de proteínas al tejido cerebral (Kalaria, 2010) que produce apoptosis, una reducción de la función sináptica y un aumento de la acumulación de A β , desembocando todo ello en la aparición del deterioro cognitivo (Deane y col, 2004).

En base a todo esto, se considera que la conexión entre hipertensión arterial y EA puede estar en la angiopatía amiloide que ésta produce (Vinters, 2001; Greenberg, 2002). Como en la EA suelen encontrarse lesiones vasculares, ambas patologías podrían tener un efecto sinérgico sobre la intensidad de la demencia. Por ello, es importante controlar los factores de riesgo vascular como la hipertensión, ya que podría contribuir a la prevención de la demencia (McCullagh y col., 2001; Maher y Schubert, 2009; Purandare, 2009). De hecho, diversos estudios epidemiológicos han encontrado que una reducción de la presión arterial podría ejercer un efecto protector sobre el deterioro cognitivo (Fogari y col., 2003, 2006).

Por otro lado, estudios clínicos sugieren que pacientes con hipertensión tratada presentan menos lesiones neuropatológicas de EA (placas seniles y ONFs) que los normotensos (Hoffman y col., 2009), datos que concuerdan con otras investigaciones que también demuestran que la hipertensión podría estar involucrada en la acumulación de depósitos de A β y la formación de ONFs (Lee y col., 2003; Bomboi y col., 2010). Además, se ha descrito un aumento de la presión arterial sistólica en pacientes con deterioro cognitivo leve y pacientes con EA instaurada en comparación con los pacientes control, existiendo una correlación entre esta hipertensión y el déficit cognitivo (Ciobica y col., 2011).

A pesar de estas evidencias, en la actualidad existe cierta controversia acerca del efecto de la presión arterial elevada sobre la función cerebral, ya que aunque hay estudios

que sugieren una conexión entre el deterioro cognitivo y la hipertensión arterial (Posner y col., 2002, Luchsinger y col., 2005), y que la hipertensión correlaciona negativamente con las funciones cognitivas, especialmente con la memoria, la atención y las funciones ejecutivas (Hanon y col., 2005; Vicario y col., 2005), otros autores no encuentran ninguna relación entre ambos (in't Veld y col., 2001; Qiu y col., 2003; Beeri y col., 2009).

Apoyando el papel de la hipertensión en el desarrollo de la EA, son cada vez más numerosos los trabajos que demuestran que el uso de ciertos fármacos antihipertensivos parece disminuir la incidencia de la EA. Por ejemplo, Lopez-Arrieta y Birks (2002) describieron que el nimodipino, un antagonista de canales de calcio, disminuye la incidencia de EA en pacientes con hipertensión. El ensayo Syst-Eur mostró que tratamientos a largo plazo con el antihipertensivo nitrendipino redujo el riesgo de demencia, y en particular de EA, en pacientes hipertensos y tras seguimiento de 2 años (Forette y col., 2002). Guo y col (1999) describieron que el uso de β -bloqueantes protege a sujetos mayores de desarrollar EA. Aún más, el estudio Cache County señaló que el uso de medicación antihipertensiva se asocia a una incidencia reducida de EA en los mayores de 65 años (Khachaturian y col., 2006).

Entre estos fármacos se encuentra el propranolol, un antagonista β -adrenérgico competitivo y no selectivo. A través de su acción sobre receptores β_1 produce una disminución de la frecuencia cardíaca, del gasto cardíaco y de la secreción de renina, contribuyendo todas estas acciones a un efecto antihipertensivo. El propranolol se usa para el control de arritmias cardíacas, hipertensión arterial esencial y renal, y para el control de la ansiedad y la taquicardia. Las dosis utilizadas habitualmente en el tratamiento de la hipertensión arterial en humanos es de 160 mg/día-320 mg/día.

Estudios *in vitro* han demostrado que el propranolol es capaz de disminuir significativamente los niveles de $A\beta$ en cultivos primarios de neuronas derivadas de un modelo transgénico de EA. Además, estudios *in vivo* han descrito que este fármaco es capaz de revertir el déficit cognitivo asociado al estrés (Roosendaal y col., 2004; Aisa y col., 2007). A pesar de estos resultados, algunos autores sugieren que la administración de propranolol afecta negativamente a la formación y consolidación de la memoria

(Murchison y col., 2004; Miranda y col., 2011; Moncada y col., 2011), datos que no concuerdan con otras publicaciones que señalan que la administración de propranolol no afecta al rendimiento cognitivo (Roosendaal y col., 2004; Kenton y col., 2008).

Por último, cabe destacar un trabajo del grupo de Wang y col. del año 2007, que estudió a nivel experimental la hipótesis de que algunos fármacos antihipertensivos podrían influir en la expresión de marcadores de EA mediante mecanismos no relacionados con su acción antihipertensiva. En concreto, en este trabajo estudiaron el efecto sobre la producción de A β de 55 fármacos antihipertensivos con distintos mecanismos de acción. De todos los fármacos estudiados, 7 fueron capaces de disminuir *in vitro* la carga de β -amiloide. De acuerdo a la "hipótesis de la cascada del amiloide", es el desequilibrio entre la producción y el aclaramiento del péptido A β lo que desencadena la neurodegeneración en la EA (Glennier y Wong, 1984; Hardy y Allsop, 1991; Hardy y Selkoe, 2002). Por lo tanto, cualquier fármaco capaz de reducir la carga de A β es un potencial candidato para el tratamiento de la enfermedad.

4. Modelos animales para el estudio de la Enfermedad de Alzheimer

Como ya se ha comentado, la etiología de la EA no está del todo clara y no existen tratamientos efectivos. Debido a la gran prevalencia y al diagnóstico tardío, el desarrollo de modelos animales ha sido una de las prioridades científicas en los últimos años, con la finalidad tanto de poder comprender los mecanismos patogénicos de la enfermedad como de probar diferentes estrategias terapéuticas. Existen numerosos modelos animales para el estudio de la EA, aunque hasta ahora no se ha conseguido ninguno que sea capaz de reproducir totalmente la naturaleza multifactorial de la enfermedad, ni todas las características patológicas que se observan en los humanos.

A continuación se describen diferentes tipos de modelos que han sido desarrollados hasta el momento, y dentro de cada grupo los más utilizados en la actualidad.

4.1. Modelos animales de EA familiar

Las mutaciones genéticas causantes de la EA de tipo familiar han conducido a la generación de diferentes líneas de ratones transgénicos que se emplean como modelos animales de EA (Janus y Westaway, 2002; Phinney y col., 2003; Walsh y Selkoe, 2004a). A pesar de que ninguno de ellos reúne todas las características neuropatológicas de la enfermedad, algunos presentan conjuntamente varias de ellas como los depósitos de amiloide, la astrocitosis, la microgliosis, la hiperfosforilación anormal de Tau y los déficits de memoria (Phinney y col., 2003).

4.1.1. Modelos transgénicos de APP

Ratones PDAPP

El primer modelo animal transgénico para la EA, fue desarrollado por Games y col. en 1995. Estos ratones, denominados PDAPP, contienen la mutación indiana (V717F) bajo el control del promotor PDGF. Este modelo expresa niveles de APP hasta 18 veces mayores que los niveles endógenos de ratones añosos, y el tamaño de las fibras de amiloide presentes en el cerebro es análogo al que se detecta en los pacientes de EA (Masliah y col., 2001; Kobayashi y Chen, 2005). A los 3 meses muestran una pérdida sináptica significativa dependiente de la edad, así como atrofia hipocampal (Dodart y col., 1999), mientras que a partir de los 6 meses se observa la presencia de depósitos de A β en el hipocampo (Games y col., 1995; Irizarry y col., 1997) y trastornos de memoria en la mayoría de las pruebas conductuales con respecto a los animales control, que aumentan con la edad y la carga amiloide (Chen y col., 2000; Arendash y col., 2001; Morgan, 2003).

Ratones Tg2576

Dentro de los animales transgénicos de APP, la línea de ratones Tg2576, es uno de los más utilizados y contrastados. Este ratón sobreexpresa la isoforma de 695 aminoácidos del gen de la APP humana conteniendo la doble mutación sueca (K670M/N671L) bajo el control de un prión de promotor de hámster (Hsiao y col., 1996). El modelo murino Tg2576 muestra signos de daño en el hipocampo a los 9-10 meses de edad, hecho que queda reflejado en el deterioro cognitivo que muestran en diferentes pruebas de comportamiento (Chapman y col., 1999; Westerman y col., 2002). La aparición de placas

seniles comienza entorno a los 9 meses de edad (Irizarry y col., 1997) y aumenta exponencialmente con la edad, de forma que a los 16 meses la carga de amiloide alcanza el 3,6% en la región CA1 del hipocampo, el 6% del giro dentado y el 8,5% de la corteza entorrinal. Los animales de esta edad, muestran así mismo una importante activación microglial que se correlaciona cualitativa y cuantitativamente con las placas neuríticas (Frautschy y col., 1998). Otro dato interesante es que a pesar de que a los 16 meses de edad los animales ya muestran un elevado número de neuritas degeneradas asociadas a placas de A β , los estudios estereológicos llevados a cabo en este modelo de la EA no muestran pérdida neuronal (Irizarry y col., 1997). Por tanto, la pérdida de memoria y de la capacidad de aprendizaje de estos animales se debería al daño sináptico que experimentan y no a una reducción en el número de neuronas.

Ratones TgCRND8

El modelo murino TgCRND8 sobreexpresa la doble mutación sueca y la mutación indiana (K670N/M671L+V717F) bajo el control de un prión de promotor de hámster, y es el modelo animal de APP más agresivo puesto que desarrolla densas placas seniles a la temprana edad de 3 meses que se correlacionan con importantes déficits cognitivos (Chishti y col., 2001) y la activación de astrocitos y microglía alrededor de dichas placas (Dudal y col., 2004).

4.1.2. Modelos transgénicos de PS

Todos los modelos basados en la carencia de PS1 o PS2 demuestran deterioro cognitivo en diferentes pruebas conductuales, pero no presentan alteraciones muy severas si se comparan con las observadas en los Tg2576. Asimismo, en ratones con ausencia de PS1 se encuentran niveles elevados de A β ₄₂ pero no se acumula formando placas seniles ni hay manifestaciones de alteraciones conductuales (Kobayashi y Chen, 2005; Spires y Hyman, 2005).

Sin embargo, cuando se cruzan ratones portadores de un gen APP mutante con ratones portadores de un gen PS1 mutante (APP+PS1) aparecen los marcadores neuropatológicos asociados a la EA, además de cambios de conducta, con mucha mayor rapidez que cuando son portadores de una sola de estas variedades transgénicas (Bales y

col., 1997), y este fue uno de los primeros modelos que mostró una fuerte correlación entre el desarrollo de $A\beta_{42}$ y el déficit cognitivo (Holcomb y col., 1999; Arendash y col., 2001).

El problema de todos estos modelos descritos hasta el momento es fundamentalmente que en humanos la mutación de APP o de alguna de las PS es suficiente para que tenga lugar el desarrollo completo de la EA, incluyendo déficit cognitivo progresivo, placas, ovillos y pérdida neuronal en el cerebro. Sin embargo, cuando estas mutaciones se expresan en los ratones transgénicos, se desarrollan algunas de estas características de la enfermedad, pero no todas.

4.1.3. Modelos transgénicos de Tau

La mayoría de modelos transgénicos, tanto en estudios iniciales como actuales, se han concentrado en la expresión de APP y de genes mutantes de presenilina, ambos asociados con formas familiares de EA, hallando un aumento de la producción de amiloide en el cerebro. Debido a que en estos modelos no se han podido demostrar presencia de ONFs o neurodegeneración, surgió la necesidad de obtener un enfoque diferente creando ratones transgénicos que expresaran la proteína Tau humana (Götz y col., 1995).

Se ha visto que ciertas mutaciones de la proteína Tau ligadas al cromosoma 17 están relacionadas con enfermedades como parkinson o demencia fronto-temporal, pero ninguna es capaz de producir la patología característica de la EA (Gendrun y Petrucelli, 2009; Iqbal y col., 2009). Ratones que sobreexpresan estas mutaciones presentan ONFs, muerte neuronal y déficits conductuales (Lewis y col., 2001; Yoshiyama y col., 2007; Rosenmann y col., 2008), pero estos modelos presentan bastantes limitaciones, ya que en algunos casos estos déficits se manifiestan en ausencia de ovillos o pérdida de neuronas (Taniguchi y col., 2005). Además, la distribución de los ONFs en la mayoría de ellos es muy diferente de la observada en la EA ya que son muy escasos en las regiones hipocampales y corticales (Zilka y col., 2009). Es importante señalar que tampoco se encontraron depósitos amiloides en estos animales (Hamilton, 1998).

4.1.4. Dobles y triples transgénicos

Ratones TAPP

Este modelo animal surgió por la necesidad de encontrar un modelo que expresara tanto placas como ONFs, combinando mutaciones típicas de FAD y mutaciones de Tau ligadas al cromosoma 17 (FTDP-17). Fue desarrollado mediante el cruzamiento de ratones Tg2576 con otra línea conocida como JNPL3 (Lewis y col., 2001), consiguiendo de esta manera la presencia de ambos marcadores neuropatológicos a los 8 meses, lo que permite examinar los efectos de A β en la formación de los ONFs.

Ratones 3xTg-AD

Otro modelo desarrollado expresa la mutación sueca de APP (K670N/M671L), y una mutación de Tau en el cromosoma 17 (P301L) combinadas con una mutación en la PS1 (M146V) (Oddo y col., 2003), dando lugar a un triple transgénico denominado 3xTg-AD.

Estos ratones desarrollan depósitos amiloides a los 6 meses de edad y una patología neurofibrilar que comienza a los 10 meses en el hipocampo y que se extiende progresivamente a la corteza. Además, presentan déficits tanto en la plasticidad sináptica como en la memoria y el aprendizaje que correlacionan con la acumulación de A β intraneuronal (Oddo y col., 2003; Billings y col., 2005).

4.1.5. Modelos transgénicos 5xFAD APP/PS1

Este modelo expresa la proteína humana APP con las mutaciones sueca, florida y london juntas con una mutación de PS1 (M146L/L286V) reguladas por el promotor Thy1, constituyendo uno de los modelos más agresivos y tempranos de patología amiloide. Estos animales se caracterizan por presentar depósitos amiloides visibles a la edad de 2 meses, y una astrogliosis y microgliosis proporcionales a los niveles de A β ₄₂, así como una pérdida neuronal muy robusta. Por otro lado, en las pruebas conductuales se observan déficits en las meorias espacial y contextual a partir de los 4-6 meses de edad (Oakley, 2006; Ohno y col., 2007).

4.2. Modelos animales de envejecimiento

Tal y como aparece explicado en el punto 1.1. del presente trabajo, la edad es el factor de riesgo más importante para sufrir EA. De ahí que sea tan importante el estudiar la relación entre el envejecimiento y las características fisiopatológicas de la enfermedad.

Los ratones SAMP8 (senescence accelerated mice prone-8), denominados así por presentar un envejecimiento acelerado son considerados en la actualidad un modelo animal robusto para el estudio de patologías asociadas a la edad, incluyendo la EA (Sureda y col., 2006; Pallas y col., 2008; Liu y col., 2010). Estos ratones fueron generados a finales de los años 70 a partir de la cepa AKR/J (Takeda y col, 1981), al observarse que a través de su mantenimiento convencional con cruzamientos entre hermanos, algunas camadas poseían características indicativas de envejecimiento acelerado similares a las que se observan en humanos de edad avanzada, como por ejemplo menor actividad física, pérdida de pelo, lordocifosis o acortamiento de vida, además de algunos trastornos de tipo neurológico (Hamamoto y col., 1984; Takeda y col., 1994), mientras que otras camadas se mostraban resistentes al envejecimiento acelerado (senescence accelerated mice resistant-1, SAMR1) y presentaban un patrón de envejecimiento normal (Takeda, 1999).

Lo más interesante es que estos ratones SAMP8 presentan déficit en el aprendizaje y la memoria a partir de los 5 meses de edad, así como depósitos cerebrales de A β (Tomobe y Nomura, 2009; Del Valle y col., 2010) y un aumento en la expresión de Tau hiperfosforilada (Canudas y col., 2005; Orejana y col., 2011).

Debido a todos estos antecedentes y a la naturaleza multifactorial de la EA, los SAMP8 se están empezando a considerar uno de los modelos animales más representativos para su estudio, ya que son capaces de mimetizar la complejidad de esta enfermedad mucho mejor que los modelos transgénicos (Pang et al., 2006).

4.3. Modelos animales de EA esporádica

Debido a que entre un 95 y un 99% de los casos la EA no se debe a causas hereditarias sino que se considera una enfermedad esporádica, además del desarrollo de

animales transgénicos para FAD, se ha intentado reproducir el componente esporádico de la enfermedad utilizando otro tipo de modelos animales.

4.3.1. Modelos animales genéticos

Numerosos estudios han confirmado que la posesión del alelo ApoE4 constituye un importante factor de riesgo para el desarrollo de EA (Bertram y col., 2007). Muchos de estos estudios han utilizado ratones que sobreexpresan APP cruzados con *knockout* para ApoE y observaron que la cantidad de A β en el cerebro decrece considerablemente, lo que indica un papel importante de ApoE en la formación de depósitos de amiloide (DeKosky, 2002).

Por otro lado, ratones transgénicos de ApoE4 muestran un incremento en la fosforilación de Tau neuronal (Tesseur y col., 2000; Brecht y col., 2004) y alteraciones sinápticas y cognitivas (Zhong y col., 2008; Ramaswamy y col., 2005).

4.3.2. Modelos animales metabólicos

Estudios epidemiológicos realizados acerca de la relación entre insulina y EA señalan que individuos diabéticos tienen un 70% más de riesgo de desarrollar demencia y EA que los no diabéticos (Xu y col., 2007). Por ello, modelos animales desarrollados para el estudio de la diabetes están empezando a utilizarse actualmente para el estudio de la EA.

Ratones ob/ob y db/db

En los modelos más utilizados para el estudio de la DM los animales presentan alteraciones en la leptina, una hormona sintetizada por los adipocitos que juega un importante papel en el metabolismo y la sensación de saciedad (Zhang y col., 1994; Shore, 2007). Los ratones *ob/ob*, descubiertos en 1949 (Ingalls y col., 1950), son el resultado de una mutación espontánea en el gen que codifica la leptina debido a una sustitución en el codón 105. En los ratones *db/db*, aunque presentan las mismas características, la causa se debe a una mutación en el dominio citoplasmático de un receptor de la leptina, Ob-R_b (Nishina y col., 1994; Schreyer y col., 1998). Debido a esta ausencia de leptina, los ratones de ambos modelos no reciben la señal de saciedad e ingieren alimento en exceso, presentando como consecuencia obesidad a partir de las 4 semanas de vida,

hiperinsulinemia, hiperglicemia, aumento de la corticosterona sérica, e incremento de los triglicéridos y el colesterol en ayunas (Leibel y col., 1997; Nishina y col., 1994). Se han observado en estos ratones además procesos neurodegenerativos como pérdida sináptica y neuronal así como Tau hiperfosforilado (Kim y col., 2009).

Es de señalar un estudio del 2010 donde se observó que el fenotipo diabético es mucho más severo en ratones *ob/ob* combinados con otros transgénicos para APP que en los ratones únicamente deficientes en leptina, y que a las 8 semanas de edad manifiestan alteraciones en el aprendizaje que no aparecen en los modelos individuales hasta varios meses más tarde (Takeda y col., 2010). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la resistencia a la insulina es un posible factor de riesgo para el desarrollo de la EA acelerando su aparición.

Ingesta hipercalórica (high fat diet, HFD)

La ingesta de una dieta hipercalórica provoca a lo largo del tiempo una obesidad y resistencia a la insulina típica de DM2. Se ha visto que animales sometidos a una dieta de estas características presentan alteraciones en la vía de señalización de la insulina, y que ratones Tg2576 alimentados con HFD durante meses muestran aumentos significativos de A β , actividad γ -secretasa y Tau, mientras que los niveles de IDE y BDNF se encuentran disminuidos (Ho y col., 2004; Kohjima y col., 2010).

El efecto agravante de la DM2 sobre la patología de la EA también ha sido comprobada con el modelo HFD en un estudio con el triple transgénico 3xTg-AD donde se observaron incrementos en los niveles de Tau soluble y un aumento de A β ₄₀ y A β ₄₂ (Julien y col., 2010).

4.3.3. Modelos animales de estrés

Existe una fuerte evidencia, proveniente tanto de estudios realizados en animales de experimentación como en estudios clínicos, de que la exposición al estrés crónico puede tener un papel importante en la etiología de diversas patologías neurodegenerativas (Kessler, 1997; Heim y Nemeroff, 1999; McEwen, 2002; Miller y O'Callaghan, 2005). En concreto, el estrés se considera como un factor de riesgo para el desarrollo y progresión de la EA (ver punto 1.1.), ya que se ha visto que es capaz de acelerar la aparición de placas de

A β y el deterioro cognitivo en modelos animales de EA (Green y col., 2006; Jeong y col., 2006; Solas y col., 2010). Estudios recientes sugieren además que un estrés crónico conduce a la hiperfosforilación de Tau (Solas y col., 2010; Briones y col., 2012), y que factores estresantes aumentan la agregación de esta proteína hiperfosforilada con respecto a animales transgénicos de Tau que no han sido sometidos a ningún tipo de estrés (Sotiropoulos y col., 2011). Un trabajo de Briones y col. (2012) mostró que de todos los animales expuestos a estrés experimentalmente, un subgrupo de ellos presentó anhedonia (disminución de la preferencia por la sacarosa) mientras que otro subgrupo se clasificó como resistente al estrés por no presentar ningún síntoma anhedónico. Sólo en el grupo anhedónico se observaron déficits cognitivos y alteraciones de los marcadores neuropatológicos de la EA que, por el contrario, no aparecían en el grupo resistente. Por lo tanto, estos modelos animales constituyen también una herramienta importante para estudiar el fenómeno de la resistencia/sensibilidad al estrés en humanos, sugiriendo que los individuos sensibles al estrés son más propensos a la aparición de trastornos de la memoria, incremento de A β , hiperfosforilación de Tau y alteraciones de neuroplasticidad, lo que podría contribuir al desarrollo de la EA (Briones y col., 2012).

Diversos modelos experimentales han sido utilizados para estudiar los efectos del estrés sobre el organismo. A continuación se describen dos de los modelos de estrés crónico que han sido validados y son ampliamente utilizados en la actualidad.

Separación materna

El modo en que hemos sido criados y el afecto que recibimos en la infancia pueden influir en el comportamiento y en la salud mental. La separación materna (MS) se desarrolló como un modelo para mimetizar los efectos de traumas vitales en la infancia (abuso infantil, pérdida parental temprana, carencia de protección, nutrición o apoyo emocional), en el posterior desarrollo de patologías neuropsicológicas.

En los últimos años diversos estudios han sugerido que un estrés en épocas tempranas de la vida, como es una MS, podría estar interfiriendo con la maduración y el desarrollo del hipocampo (Huot y col., 2002; Aisa y col., 2009), de manera que la exposición a niveles elevados de GC durante esta época podría conducir a una mayor

vulnerabilidad de desarrollar enfermedades psiquiátricas, así como déficits cognitivos (Huot y col., 2002; Aisa y col., 2009, Solas y col., 2010). De hecho, un estudio reciente ha relacionado la MS con un incremento de los niveles de A β hipocampales, como consecuencia de un aumento del procesamiento amiloidogénico de APP y una disminución en la expresión de IDE (Solas y col., 2010).

Estrés crónico suave

El estrés crónico suave (ECS) se desarrolló como un modelo para mimetizar los factores ambientales adversos que contribuyen a la inducción de los desórdenes depresivos en humanos, y es capaz de reproducir cambios en el comportamiento que perduran durante meses. Se considera uno de los mejores modelos en cuanto a su validez predictiva, constructiva y aparente (Willner y Mitchell, 2002).

Estudios recientes señalan que este modelo es capaz de inducir un deterioro en la memoria de reconocimiento (Orsetti y col., 2006; Elizalde y col., 2008) y en la memoria espacial (Song y col., 2006), así como una disminución de la proliferación celular y de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo (Mineur y col., 2007; Kong y col., 2009). Algunos trabajos también han mostrado cómo el ECS induce un aumento de la apoptosis hipocampal y cortical (Bachis y col., 2008; Silva y col., 2008) y diversas modificaciones en numerosos marcadores de plasticidad neuronal. Por ejemplo, el ECS produce una regulación a la baja del factor neurotrófico BDNF (Duman y Monteggia, 2006; Li y col., 2008).

Todos estos antecedentes son la base por la cual cada vez hay más estudios que hablan de una posible relación causa-efecto entre el estrés y el desarrollo de enfermedades neuropsicopatológicas asociadas a la edad (Heim y Nemeroff, 1999; McEwen, 2002; Miller y O'Callaghan, 2005). A pesar de que los estudios acerca de este tema no son todavía muy numerosos, cada vez es mayor el interés en conocer los mecanismos responsables de la interacción entre el estrés, la memoria y la EA.

En resumen, el desarrollo de diferentes modelos animales en los últimos años ha supuesto un gran avance para el estudio de la EA, ya que a pesar de que ningún animal muestra todas las características de la enfermedad, y de que estos modelos no son

perfectos, han desempeñado un papel crucial en el progresivo conocimiento de la fisiopatología de la EA. Además, la posibilidad de combinar diferentes animales transgénicos entre si o la evaluación de diferentes fármacos en cada uno de ellos, abren un amplio abanico de posibilidades que pueden servir para un mejor estudio de los mecanismos implicados en la alteración de las vías de la EA, así como para la búsqueda de mejores estrategias terapéuticas y preventivas para el deterioro cognitivo.

Bibliografía

Abraham IM, Harkany T, Horvath KM, Luiten PG. (2001). Action of glucocorticoids on survival of nerve cells: promoting neurodegeneration or neuroprotection? *Journal of Neuroendocrinology* 13: 749–760.

Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. (2009). Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus* 19: 1222-1231.

Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32: 256-266.

Aisen PS. (2002). The potential of anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Lancet Neurology* 1: 279-284.

Almeida CG, Tampellini D, Takahashi RH, Greengard P, Lin MT, Snyder EM, Gouras GK. (2005). Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiology of Disease* 20: 187-198.

Almeida OP, Flicker L. (2005). Association between hormone replacement therapy and dementia: is it time to forget? *International Psychogeriatric* 17: 155-164.

Arendash GW, King DL, Gordon MN, Morgan D, Hatcher JM, Hope CE, Diamond DM. (2001). Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Research* 891: 42-53.

Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. (1991). The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral Cortex* 1: 103-116.

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42: 631-639.

Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA. (2004). Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Archives of Neurology* 61: 661-666.

Atance Martínez JC, Yusta Izquierdo A, Grupeli Gardel BE. (2004). Costs study in Alzheimer's disease. *Revista Clínica Española* 204: 64-69.

Authier F, Posner BI, Bergeron JJ. (1996). Insulin-degrading enzyme. *Clinical and Investigative Medicine* 19: 149-60.

Avila J. (2006). Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Letters* 580: 2922-2927.

Bachis A, Cruz MI, Nosheny RL, Mocchetti I. (2008) Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex. *Neuroscience Letters* 442: 104-108.

Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du YS, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM. (1997). Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β -peptide deposition. *Nature Genetics* 17: 263-264.

Beeri MS, Ravona-Springer R, Silverman JM, Haroutunian V. (2009). The effects of cardiovascular risk factors on cognitive compromise. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 11: 201-212.

Bertram L, Hsiao M, McQueen MB, Parkinson M, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. (2007). The LDLR locus in Alzheimer's disease: a family-based study and meta-analysis of case-control data. *Neurobiology of Aging* 28: 18e1-4.

Bibel M, Barde YA. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & Development* 14: 2919-2937.

Biessels GJ, Kappelle LJ. (2005). Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochemical Society Transactions* 33: 1041-1044.

Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. (2005). Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45: 675-688.

Binder DK, Scharfman HE. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22: 123-131.

Blanpied TA, Ehlers MD. (2004). Microanatomy of dendritic spines: emerging principles of synaptic pathology in psychiatric and neurological disease. *Biological Psychiatry* 55: 1121-1127.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* 368: 387-403.

Bomboi G, Castello L, Cosenino F, Giubilei F, Orzi F, Volpe M. (2010). Alzheimer's disease and endothelial dysfunction. *Journal of the Neurological Sciences* 31: 1-8.

Braak E, Braak H, Mandelkow EM. (1994). A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathologica* 87: 554-567.

Braak H, Braak E. (1995). Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of Aging* 16: 271-278.

Brecht WJ, Harris FM, Chang S, Tesseur I, Yu GQ, Xu Q, Dee Fish J, Wyss-Coray T, Buttini M, Mucke L, Mahley RW, Huang Y. (2004). Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. *Journal of Neuroscience* 24: 2527-2534.

Brinks V, van der Mark MH, de Kloet ER, Oitzl MS. (2007). Differential MR/GR activation in mice results in emotional states beneficial or impairing for cognition. *Neural Plasticity* : 90163.

Briones A, Gagno S, Martisova E, Dobarro M, Aisa B, Solas M, Tordera R, Ramírez MJ. (2012). Stress-induced anhedonia is associated with an increase in Alzheimer's disease-related markers. *British Journal of Pharmacology* 165: 897-907.

Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dementia* 3: 186-191.

Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA. (1995). Beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14: 879-888.

Butters MA, Klunk WE, Mathis CA, Price JC, Ziolkowski SK, Hoge JA, Tsopelas ND, Lopresti BJ, Reynolds CF 3rd, DeKosky ST, Meltzer CC. (2008). Imaging Alzheimer pathology in late-life depression with PET and Pittsburgh Compound-B. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 22: 261-268.

Caceres A, Kosik KS. (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343: 461-463.

Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE, Jones T, Banati RB. (2001). In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet* 358: 461-467.

Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallàs M. (2005). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mechanisms of Ageing and Development* 126: 1300-1304.

Chang W.P., Koelsch G., Wong S., Downs D., Da H., Weerasena V., Gordon B., Devasamudram T., Bilcer G., Ghosh A.K., Tang J. (2004). In vivo inhibition of Abeta production by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors. *Journal of Neurochemistry*. 89: 1409-1416.

Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature Neuroscience* 2: 271-276.

Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. (2001). Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biological Psychiatry* 50: 260-265.

Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman SB, Morris RG. (2000). A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 975-979.

Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, Strome R, Zuker N, Loukides J, French J, Turner S, Lozza G, Grilli M, Kunicki S, Morissette C, Paquette J, Gervais F, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, George-Hyslop PS, Westaway D. (2001). Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *Journal of Biological Chemistry* 276: 21562-21570.

Chun W, Johnson GV. (2007). The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death. *Frontiers in Bioscience* 12: 733-756.

Ciobica A, Padurariu M, Bild W, Stefanescu C. (2011). Cardiovascular risk factors as potential markers for mild cognitive impairments and Alzheimer's disease. *Psychiatria Danubina* 4: 340-346.

Craft S, Newcomer J, Kanne S, Dagogo-Jack S, Cryer P, Sheline Y, Luby J, Dagogo-Jack A, Alderson A. (1996). Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 17: 123-130.

Crews L, Masliah E, (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics* 19: 12-20.

Csernansky JG, Dong H, Fagan AM, Wang L, Xiong C, Holtzman DM, Morris JC. (2006). Plasma cortisol and progression of dementia in subjects with Alzheimer-type dementia. *American Journal of Psychiatry* 163: 2164-2169.

Cummings JL. (2004). Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine* 351: 56-67.

Cummings JL, Cole G. (2002). Alzheimer disease. *JAMA* 287: 2335-2338.

De Camilli P, Jahn R. (1990). Pathways to regulated exocytosis in neurons. *Annual Review of Physiology* 52: 625-645.

De Kloet ER, Oitzl MS, Joels M. (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends in Neurosciences* 22: 422-426.

De la Monte SM, Tong M, Lester-Coll N, Plater M, Jr., Wands JR. (2006). Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 10: 89-109.

Deane R, Wu Z, Zlokovic BV. (2004). RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates Alzheimer amyloid β -peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke* 35: 2628-2631.

DeKosky S, Scheff S. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. *Annals of Neurology* 27: 457-464.

DeKosky ST. (2002). Neurobiología y biología molecular de la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Neurología* 35: 752-760.

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

Di Carlo A, Baldereschi M, Amaducci L, Lepore V, Bracco L, Maggi S, Bonaiuto S, Perissinotto E, Scarlato G, Farchi G, Inzitari D. (2002). Incidence of dementia, Alzheimer's disease, and vascular dementia in Italy. The ILSA Study. *Journal of the American Geriatrics Society* 50: 41-48.

Dodart JC, Meziane H, Mathis C, Bales KR, Paul SM, Ungerer A. (1999). Behavioral disturbances in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. *Behavioral Neuroscience* 113: 982-990.

Drubin DG, Kirschner MW. (1986). Tau protein function in living cells. *Journal of Cell Biology* 103: 2739-2746.

Dudal S, Krzywkowski P, Paquette J, Morissette C, Lacombe D, Tremblay P, Gervais F. (2004). Inflammation occurs early during the Abeta deposition process in TgCRND8 mice. *Neurobiology of Aging* 25: 861-871.

Duman RS, Monteggia LM. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological Psychiatry* 59: 1116-1127.

Durán MA. (2000). Los costes invisibles de la enfermedad. Madrid: Fundación BBV.

Elgh E, Lindqvist Astot A, Fagerlund M, Eriksson S, Olsson T, Nasman B. (2006). Cognitive dysfunction, hippocampal atrophy and glucocorticoid feedback in Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry* 59: 155-161.

Elizalde N, Gil-Bea FJ, Ramírez MJ, Aisa B, Lasheras B, Del Rio J, Tordera RM. (2008). Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment. *Psychopharmacology* 199: 1-14.

Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenberg A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. (2002). Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA* 287: 3223-3229.

Fagard R, Gil-Extremera B, Laks T, Kobalava Z, Sarti C, Tuomilehto J, Vanhanen H, Webster J, Yodfat Y, Birkenhager WH. (2002). The prevention of dementia with antihypertensive treatment: new evidence from the Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) study. *Archives of Internal Medicine* 162: 2046-2052.

Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 4162-4167.

Figueiredo-Pereira ME, Efthimiopoulos S, Tezapsidis N, Buku A, Ghiso J, Mehta P, Robakis NK. (1999). Distinct secretases, a cysteine protease and a serine protease, generate the C termini of amyloid beta-proteins Abeta1-40 and Abeta1-42, respectively. *Journal of Neurochemistry* 72: 1417-1422.

Fogari R, Mugellini A, Zoppi A, Derosa G, Pasotti C, Fogari E, Preti P. (2003). Influence of losartan and atenolol on memory function in very elderly hypertensive patients. *Journal of Human Hypertension* 17: 781-785.

Fogari R, Mugellini A, Zoppi A, Lazzari P, Destro M, Rinaldi A, Preti P. (2006). Effect of telmisartan/hydrochlorothiazide vs lisinopril/hydrochlorothiazide combination on ambulatory blood pressure and cognitive function in elderly hypertensive patients. *Journal of Human Hypertension* 20: 177-185.

Forette F, Seux ML, Staessen JA, Thijs L, Babarskiene MR, Babeanu S, Bossini A, Fagard R, Gil-Extremera B, Laks T, Kopalava Z, Sarti C, Tuomilehto J, Vanhanen H, Webster J, Yodfat Y, Birkenhager WH. (2002). The prevention of dementia with antihypertensive treatment: new evidence from the Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) study. *Archives of Internal Medicine* 162: 2046-2052.

Frautschy S, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K, Cole GM. (1998). Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *American Journal of Pathology* 152: 307-317.

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagoplan S, Johnson-Wood K, Kan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice over-expressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 373: 523-527.

Gendron TF, Petrucelli L. (2009). The role of tau in neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration* 11: 4-13.

Gil-Bea FJ, Aisa B, Solomon A, Solas M, del Carmen Mugueta M, Winblad B, Kivipelto M, Cedazo-Mínguez A, Ramírez MJ. (2010). HPA axis dysregulation associated to apolipoprotein E4 genotype in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 22: 829-838.

Glennner GG, Wong CW. (1984). Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 122: 1131-1135.

Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA. (1991). Tau proteins and neurofibrillary degeneration. *Brain Pathology* 1: 279-286.

Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA. (1989). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *The EMBO Journal* 8: 393-399.

Goedert M, Spillantini MG., Crowther RA. (1991). Tau proteins and neurofibrillary degeneration. *Brain Pathology* 1: 279-286.

Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2005). Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission* 112: 813-838.

Götz J, Probst A, Spillantini MG, Schäfer T, Jakes R, Bürki K, Goedert M. (1995). Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *The EMBO Journal* 14: 1304-1313.

Green KN, Billings LM, Roozendaal B, McGaugh JL, La Ferla FM. (2006). Glucocorticoids increase amyloid-beta and Tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 26: 9047-9056.

Greenberg SM. (2002). Cerebral amyloid angiopathy and dementia. Two amyloids are worse than one. *Neurology* 58: 1587-1588.

Guo Z, Viitanen M, Winblad B, Fratiglioni L. (1999). Low blood pressure and incidence of dementia in a very old sample: dependent on initial cognition. *Journal of the American Geriatrics Society* 47: 723-726.

Haas C. (2012). Strategies, Development, and Pitfalls of Therapeutic Options for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 28: 241-281.

Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359: 322-325.

Hama E, Saido TC. (2005). Etiology of sporadic Alzheimer's disease: somatostatin, neprilysin, and amyloid beta peptide. *Medical Hypotheses* 65: 498-500.

Hamamoto H, Honma A, Irino M, Matsushita T, Toda K, Matsumura M, Takeda T. (1984). Grading score system: A method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mechanisms of Ageing and Development* 26: 91-102.

Hamilton RL. (1998). Neuropatología experimental de la enfermedad de Alzheimer: modelos animales. *Revista de Neurología* 27: s80-84.

Hanon O, Seux ML, Lenoir H, Latour F, Rigaud AS, Forette F. (2005). Cognitive functions and hypertension. *Archives des Maladies du Coeur Vaisseaux* 98: 133-139.

Hardy J, Allsop D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 12: 383-388.

Hardy J, Selkoe DJ. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356.

Hartmann A, Veldhuis JD, Deuschle M, Standhardt H, Heuser I. (1997). Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: ultradian secretory pulsatility and diurnal variation. *Neurobiology of Aging* 18: 285-289.

Hatfield CF, Herbert J, van Someren EJ, Hodges JR, Hastings MH. (2004). Disrupted daily activity/rest cycles in relation to daily cortisol rhythms of home-dwelling patients with early Alzheimer's dementia. *Brain* 127: 1061-1074.

He X, Cooley K, Chung CH, Dashti N, Tang J. (2007). Apolipoprotein receptor 2 and X11 alpha/beta mediate apolipoprotein E-induced endocytosis of amyloid-beta precursor protein and beta-secretase, leading to amyloid-beta production. *Journal of Neuroscience* 27: 4052-4060.

Heim C, Nemeroff CB. (1999). The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biological Psychiatry* 46: 1509-1522.

Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van Leuven F. (2005). Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *Journal of Neuroinflammation* 2: 22.

Ho L, Qin W, Pompl PN, Xiang Z, Wang J, Zhao Z, Peng Y, Cambareri G, Rocher A, Mobbs CV, Hof PR, Pasinetti GM. (2004). Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB Journal* 18: 902-904.

Hoffman LB, Schmeidler J, Lesser GT, Beeri MS, Purohit DP, Grossman HT, Haroutunian V. (2009). Less Alzheimer disease neuropathology in medicated hypertensive than nonhypertensive persons. *Neurology* 72: 1720-1726.

Hoglund K, Thelen KM, Syversen S, Sjogren M, von Bergmann K, Wallin A, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Lutjohann D, Blennow K. (2005). The effect of simvastatin treatment on the amyloid precursor protein and brain cholesterol metabolism in patients with Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 19: 256-265.

Holcomb LA, Gordon MN, Jantzen P, Hsiao K, Duff K, Morgan D. (1999). Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behavior Genetics* 29: 177-185.

Hoogendijk WJ, Meynen G, Endert E, Hofman MA, Swaab DF. (2006). Increased cerebrospinal fluid cortisol level in Alzheimer's disease is not related to depression. *Neurobiology of Aging* 27: 780-781.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. (1996). Correlative memory deficits, A β elevation and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274: 99-102.

Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R. (2006). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52: 831-843.

Huang Y. (2006). Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurology* 66: 79-85.

Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Research* 950: 52-63.

Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. (1950) Obese, a new mutation in the house mouse. *Journal of Heredity* 41: 317-318.

in't Veld BA, Ruitenbergh A, Hofman A, Stricker BH, Breteler MM. (2001). Antihypertensive drugs and incidence of dementia: the Rotterdam Study. *Neurobiology of Aging* 22: 407-412.

Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso AC, Grundke-Iqbal I. (2009). Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathologica* 118: 53-69.

Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT. (1997). APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 56: 965-973.

Janus C, Westaway D. (2001). Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiology & Behavior* 73: 873-886.

Jeong YH, Park CH, Yoo J, Shin KY, Ahn SM, Kim HS, Lee SH, Emson PC, Suh YH. (2006). Chronic stress accelerates learning and memory impairments and increases amyloid deposition in APPV717I-CT100 transgenic mice, an Alzheimer's disease model. *FASEB Journal* 20: 729-731.

Jin LW, Ninomiya H, Roch JM, Schubert D, Masliah E, Otero DA, Saitoh T. (1994). Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *Journal of Neuroscience* 14: 5461-5470.

Jorm, A. (2000). Risk factors for Alzheimer's disease. En: *Dementia*, second edition. J. O'Brien, D. Ames, A. Burns (editores). London, Arnold, pp 383-390.

Julien C, Tremblay C, Phivilay A, Berthiaume L, Emond V, Julien P, Calon F. (2010). High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiology of Aging* 31: 1516-1531.

Kalaria RN. (2010). Vascular basis for brain degeneration: faltering controls and risk factors for dementia. *Nutrition Reviews* 68: s74-87.

Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. (1997). Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Annals of Neurology* 42: 776-782.

Kenton L, Boon F, Cain DP. (2008). Combined but not individual administration of beta-adrenergic antagonists impairs water maze acquisition in the rat. *Neuropsychopharmacology* 33: 1298-1311.

Kessler RC. (1997). The effects of stressful life events on depression. *Annual Review of Psychology* 48: 191-214.

Khachaturian AS, Zandi PP, Lyketsos CG, Hayden KM, Skoog I, Norton MC, Tschanz JT, Mayer LS, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC. (2006). Antihypertensive medication use and incident Alzheimer disease: the Cache County Study. *Archives of Neurology* 63: 686-692.

Kim B, Backus C, Oh S, Hayes JM, Feldman EL. (2009). Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology* 150: 5294-5301.

Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MO, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. (2001a). Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *British Medical Journal* 322: 1447-1451.

Kivipelto M, Helkala EL, Hänninen T, Laakso MP, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. (2001b). Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study. *Neurology* 56: 1683-1689.

Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, Kåreholt I, Winblad B, Helkala EL, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A. (2005). Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Archives of Neurology* 62: 1556-1560.

Knobloch M, Mansuy IM. (2008). Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology* 37: 73-82.

Kobayashi DT, Chen KS. (2005). Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models of Alzheimer's disease. *Genes, Brain, and Behavior* 4: 173-196.

Kohjima M, Sun Y, Chan L. (2010). Increased food intake leads to obesity and insulin resistance in the tg2576 Alzheimer's disease mouse model. *Endocrinology* 151: 1532-1540.

Kong H, Sha LL, Fan Y, Xiao M, Ding JH, Wu J, Hu G. (2009). Requirement of AQP4 for antidepressive efficiency of fluoxetine: implication in adult hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 34: 1263-1276.

Kril JJ, Harding AJ, Halliday GM. (2002). Patients with vascular dementia due to microvascular pathology have significant hippocampal neuronal loss. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 72: 747-751.

Kurochkin IV, Goto S. (1994). Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Letters* 345: 33-37.

Laitinen MH, Ngandu T, Rovio S, Helkala EL, Uusitalo U, Viitanen M, Nissinen A, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. (2006). Fat intake at midlife and risk of dementia and Alzheimer's disease: a population-based study. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 22: 99-107.

Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 96: 3922-3927.

Launer LJ, Hofman A. (2000). Frequency and impact of neurologic diseases in the elderly of Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurology* 54: 1-8.

Lee BC, Mintun M, Buckner RL, Morris JC. (2003). Imaging of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimaging* 13: 199-214.

Lee J, Fukumoto H, Orne J, Klucken J, Raju S, Vanderburg CR, Irizarry MC, Hyman BT, Ingelsson M. (2005). Decreased levels of BDNF protein in Alzheimer temporal cortex are independent of BDNF polymorphisms. *Experimental Neurology* 194: 91-96.

Leibel RL, Chung WK, Chua SC Jr. (1997). The molecular genetics of rodent single gene obesities. *Journal of Biological Chemistry* 272: 31937-31940.

Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, Cha R, Kokmen E, O'Brien PC, Palumbo PJ. (1997). Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *American Journal of Epidemiology* 145: 301-308.

Lewis J, Dickson D, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293: 1487-1491.

Li S, Wang C., Wang W, Dong H, Hou P, Tang Y. (2008). Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior. *Life Sciences* 82: 934-942.

Liu W, Liu C, Zhu J, Shu P, Yin B, Gong Y, Qiang B, Yuan J, Peng X. (2010). MicroRNA-16 targets amyloid precursor protein to potentially modulate Alzheimer's-associated pathogenesis in SAMP8 mice. *Neurobiology of Aging* 33: 522-534.

Lopez-Arrieta JM, Birks J. (2002). Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia. *Cochrane database of systematic reviews (Online)* CD000147.

Love S, Siew LK, Dawbarn D, Wilcock GK, Ben-Shlomo Y, Allen SJ. (2006). Premorbid effects of APOE on synaptic proteins in human temporal neocortex. *Neurobiology of Aging* 27: 797-803.

Luchsinger JA, Reitz C, Honig LS, Tang MX, Shea S, Mayeux R. (2005). Aggregation of vascular risk factors and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology* 65: 545-551.

Luchsinger JA, Tang MX, Stern Y, Shea S, Mayeux R. (2001). Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort. *American Journal of Epidemiology* 154: 635-641.

Luo C, Xu H, Li XM. (2004). Post-stress changes in BDNF and Bcl-2 immunoreactivities in hippocampal neurons: effect of chronic administration of olanzapine. *Brain Research* 1025: 194-202.

Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R. (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nature Neuroscience* 4: 231-232.

Maher PA, Schubert DR. (2009). Metabolic links between diabetes and Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics* 9:617-630.

Martignoni E, Petraglia F, Costa A, Bono G, Genazzani AR, Nappi G. (1990). Dementia of the Alzheimer type and hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis: changes in cerebrospinal fluid corticotrophin releasing factor and plasma cortisol levels. *Acta Neurologica Scandinavica* 81: 452-456.

Masliah E, Ellisman M, Carragher B, Mallory M, Young S, Hansen L, DeTeresa R, Terry RD. (1992). Three-dimensional analysis of the relationship between synaptic pathology and neuropil threads in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 51: 404-414.

Masliah E, Sisk A, Mallory M, Games D. (2001). Neurofibrillary pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 60: 357-368.

Matsui T, Ramasamy K, Ingelsson M, Fukumoto H, Conrad C, Frosch MP, Irizarry MC, Yuan J, Hyman BT. (2006). Coordinated expression of caspase 8, 3 and 7 mRNA in temporal cortex of Alzheimer disease: relationship to formic acid extractable abeta42 levels. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 65: 508-515.

Mattson MP. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430: 631-639.

Mayeux R. (2003). Epidemiology of neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience* 26: 81-104.

McCullagh CD, David Craig, Stephen P, McIlroy A, Peter P. (2001) Risk factors for dementia. *Advances in Psychiatric Treatment* 7:24-31.

McDermott JR, Gibson AM. (1997). Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochemical Research* 22: 49-56.

McEwen BS. (2002). Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiology of Aging* 23: 921-939.

McGeer PL, McGeer EG. (2007). NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiology of Aging* 28: 639-647.

Meilandt WJ, Cisse M, Ho K, Wu T, Esposito LA, Scarce-Levie K, Cheng IH, Yu G, Mucke L. (2009). Nepriylsin overexpression inhibits plaque formation but fails to reduce pathogenic A β oligomers and associated cognitive deficits in human amyloid precursor protein transgenic mice. *Journal of Neuroscience* 29: 1977-1986.

Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A. (1998). Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 12683-12688.

Miller DB, O'Callaghan JP. (2005). Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Research Reviews* 4: 123-140.

Mineur YS, Belzung C, Crusio WE. (2007). Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. *Neuroscience* 150: 251-259.

Miranda MI, Sabath E, Nuñez-Jaramillo L, Purón-Sierra L. (2011). B-Adrenergic receptors in the insular cortex are differentially involved in aversive vs. incidental context memory formation. *Learning & memory* 18: 502-507.

Modrego P, Fernandez J. (2004). Depression in patients with mild cognitive impairment increases the risk of developing dementia of Alzheimer type: a prospective cohort study. *Archives of Neurology* 61: 1290-1293.

Moncada D, Ballarini F, Martinez MC, Frey JU, Viola H. (2011). Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 12931-12936.

Morgan D. (2003). Learning and memory deficits in APP transgenic mouse models of amyloid deposition. *Neurochemical Research* 28: 1029-1034.

Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Watanabe A, Titani K, Ihara Y. (1995). Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiology of Aging* 16: 365-371.

Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, Schneider J, Wilson RS. (2003). Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. *Archives of Neurology* 60: 194-200.

Mudher A, Lovestone S. (2002). Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends in Neurosciences* 25: 22-26.

Murchison CF, Zhang XY, Zhang WP, Ouyang M, Lee A, Thomas SA. (2004). A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell* 117: 131-143.

Murer MG., Boissiere F, Yan Q, Hunot S, Villares J, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E, Raisman-Vozari R. (1999). An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease. *Neuroscience* 88: 1015-1032.

Murer MG., Yan Q, Raisman-Vozari R. (2001). Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 3: 71-124.

Narisawa-Saito M, Wakabayashi K, Tsuji S, Takahashi H, Nawa H. (1996). Regional specificity of alterations in NGF, BDNF and NT-3 levels in Alzheimer's disease. *NeuroReport* 7: 2925-2928.

Newman AB, Fitzpatrick AL, Lopez O, Jackson S, Lyketsos C, Jagust W, Ives D, Dekosky ST, Kuller LH. (2005). Dementia and Alzheimer's disease incidence in relationship to cardiovascular disease in the Cardiovascular Health Study cohort. *Journal of the American Geriatrics Society* 53: 1101-1107

Nishina PM, Lowe S, Wang J, Paigen B. (1994). Characterization of plasma lipids in genetically obese mice: the mutants obese, diabetes, fat, tubby, and lethal yellow. *Metabolism* 43: 549-553.

Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *Journal of Neuroscience* 26: 10129-10140.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39: 409-421.

Ohno M, Cole SL, Yasvoina M, Zhao J, Citron M, Berry R, Disterhoft JF, Vassar R. (2007). BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiology of Disease* 26: 134-145.

Orejana L, Barros-Miñones L, Jordán J, Puerta E, Aguirre N. (2011). Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model. *Neurobiology of Aging* 33: 625.e11-20.

Orsetti M, Colella L, Dellarole A, Luigi Canonico P, Ghi P. (2006). Modification of spatial recognition memory and object discrimination after chronic administration of haloperidol, amitriptyline, sodium valproate or olanzapine in normal and anhedonic rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 7: 1-13.

Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM. (1999). Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* 53: 1937-1942.

Pallas M, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesus G. (2008). From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *Journal of Alzheimer's Disease* 15: 615-624.

Pang KCH, Miller JP, Fortress A, McAuley D. (2006). Age-related disruptions of circadian rhythm and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM8). *Age* 28: 283-296.

Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR. (1996). Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* 17: 553-565.

Patterson MB, Schnell AH, Martin RJ, Mendez MF, Smyth KA, Whitehouse PJ. (1990). Assessment of behavioral and affective symptoms in Alzheimer's disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 3: 21-30.

Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnstock M. (2005). Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 93: 1412-1421.

Perez RG, Zheng H, Van der Ploeg LH, Koo EH. (1997). The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *Journal of Neuroscience* 17: 9407-9414.

Petersen RC, Thomas RG, Grundman M, Bennett D, Doody R, Ferris S, Galasko D, Jin S, Kaye J, Levey A, Pfeiffer E, Sano M, van Dyck CH, Thal LJ. (2005). Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *New England Journal of Medicine* 352: 2379-2388.

Petit A, Bihel F, Alves da Costa C, Pourquie O, Checler F, Kraus JL. (2001). New protease inhibitors prevent gamma-secretase-mediated production of Abeta40/42 without affecting Notch cleavage. *Nature Cell Biology* 3: 507-511.

Pfennig A, Littmann E, Bauer M. (2007). Neurocognitive impairment and dementia in mood disorders. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 19: 373-382.

Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramée GR, Johnson SA, Winslow JW. (1991). BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 7: 695-702.

Phinney AL, Horne P, Yang J, Janus C, Bergeron C, Westaway D. (2003). Mouse models of Alzheimer's disease: the long and filamentous road. *Neurological Research* 25: 590-600.

Popp J, Schaper K, Kölsch H, Cvetanovska G, Rommel F, Klingmüller D, Dodel R, Wüllner U, Jessen F. (2009). CSF cortisol in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging* 30: 498-500.

Posner HB, Tang MX, Luchsinger J, Lantigua R, Stern Y, Mayeux R. (2002). The relationship of hypertension in the elderly to AD, vascular dementia, and cognitive function. *Neurology* 58: 1175-1181.

Purandare N, Burns A, Daly KJ, Hardicre J, Morris J, Macfarlane G, McCollum C. (2006). Cerebral emboli as a potential cause of Alzheimer's disease and vascular dementia: case-control study. *British Medical Journal* 332: 1119-1124.

Purandare N. (2009). Preventing dementia: role of vascular risk factors and cerebral emboli. *British Medical Bulletin* 91: 49-59.

Querfuth HW, LaFerla FM. (2010). Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine* 28: 319-344.

Qiu C, von Strauss E, Fastbom J, Winblad B, Fratiglioni L. (2003). Low blood pressure and risk of dementia in the Kungsholmen project: a 6-year follow-up study. *Archives of Neurology* 60: 223-228.

Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 32730-32738.

Ramaswamy G, Xu Q, Huang Y, Weisgraber KH. (2005). *Journal of Neuroscience* 25: 10658-10663.

Rapp MA, Schnaider-Beeri M, Grossman HT, Sano M, Perl DP, Purohit DP, Gorman JM, Haroutunian V. (2006). Increased hippocampal plaques and tangles in patients with Alzheimer disease with a lifetime history of major depression. *Archives of General Psychiatry* 63: 161-167.

Rehm H, Wiedenmann B, Betz H. (1986). Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *The EMBO Journal* 5: 535-541.

Reifler BV, Larson E, Hanley R. (1982). Coexistence of cognitive impairment and depression in geriatric outpatients. *American Journal of Psychiatry* 139: 623-626.

Roosendaal B, Griffith QK, Buranday J, De Quervain DJ, McGaugh JL. (2003). The hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: dependence on the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 1328-1333.

Rooszendaal B, Hahn EL, Nathan SV, de Quervain DJ, McGaugh JL. (2004). Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. *Journal of Neuroscience* 24: 8161-8169.

Rosenmann H, Grigoriadis N, Eldar-Levy H, Avital A, Rozenstein L, Touloumi O, Behar L, Ben-Hur T, Avraham Y, Berry E, Segal M, Ginzburg I, Abramsky O. (2008). A novel transgenic mouse expressing double mutant tau driven by its natural promoter exhibits tauopathy characteristics. *Experimental Neurology* 212: 71-84.

Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant earlyonset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature Genetics* 38: 24-26.

Sabbagh MN, Walker DG, Reid RT, Stadnick T, Anand K, Lue LF. (2008). Absence of effect of chronic nicotine administration on amyloid beta peptide levels in transgenic mice overexpressing mutated human APP (Sw, Ind). *Neuroscience Letters* 448: 217-220.

Sandi C, Pinelo-Nava MT. (2007). Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plasticity* 78970.

Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ. (2007). Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 68: 1501-1508.

Scheff SW, Price DA. (1993). Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 33: 190-199.

Scheff SW, Price DA. (2006). Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus. *Journal of Alzheimer's Disease* 9: 101-115.

Scheff SW, Sparks L, Price DA. (1993). Quantitative assessment of synaptic density in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 34: 356-361.

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandever C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400: 173-177.

Schenk D, Hagen M, Seubert P. (2004). Current progress in beta-amyloid immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* 16: 599-606.

Schmidt R, Kienbacher E, Benke T, Dal-Bianco P, Delazer M, Ladurner G, Jellinger K, Marksteiner J, Ransmayr G, Schmidt H, Stogmann E, Friedrich J, Wehringer C. (2008). Sex differences in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatry* 22: 1-15.

Schreyer SA, Chua SC Jr, LeBoeuf RC. (1998). Obesity and diabetes in TNF-alpha receptor-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* 102: 402-411.

Selkoe DJ. (1997). Images in neuroscience. Alzheimer's disease: from genes to pathogenesis. *American Journal of Psychiatry* 154: 1198.

Selkoe DJ. (2000). Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Annals of the New York Academy of Sciences* 924: 17-25.

Selkoe DJ. (2001a). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 81: 741-766.

Selkoe DJ. (2001b). Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* 32: 177-180.

Selkoe DJ. (2004). Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nature Cell Biology* 6: 1054-1061.

Sheng JG, Price DL, Koliatsos VE. (2002). Disruption of corticocortical connections ameliorates amyloid burden in terminal fields in a transgenic model of Abeta amyloidosis. *Journal of Neuroscience* 22: 9794-9799.

Shimura H, Schwartz D, Gygi SP, Kosik KS. (2004). CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *Journal of Biological Chemistry* 279: 4869-4876.

Shivers BD, Hilbich C, Multhaup G, Salbaum M, Beyreuther K, Seeburg PH. (1988). Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact. *The EMBO Journal* 7: 1365-1370.

Shore SA. (2007). Obesity and asthma: lessons from animal models. *Journal of Applied Physiology* 102: 516-528.

Shumaker SA, Legault C, Kuller L, Rapp SR, Thal L, Lane DS, Fillit H, Stefanick ML, Hendrix SL, Lewis CE, Masaki K, Coker LH. (2004). Conjugated equine estrogens and incidence of probable dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study. *JAMA* 291: 2947-2958.

Siemers E, Skinner M, Dean RA, Gonzales C, Satterwhite J, Farlow M, Ness D, May PC. (2005). Safety, tolerability, and changes in amyloid beta concentrations after administration of a gamma-secretase inhibitor in volunteers. *Clinical Neuropharmacology* 28: 126-132.

Silva R, Mesquita AR, Bessa J, Sousa JC, Sotiropoulos I, Leao P, Almeida OF, Sousa N. (2008). Lithium blocks stress-induced changes in depressive-like behaviour and hippocampal cell fate: the role of glycogen-synthase-kinase-3beta. *Neuroscience* 152: 656-669.

Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402: 537-540.

Small GW, Rabins PV, Barry PP, Buckholtz NS, DeKosky ST, Ferris SH, Finkel SI, Gwyther LP, Khachaturian ZS, Lebowitz BD, McRae TD, Morris JC, Oakley F, Schneider LS, Streim JE, Sunderland T, Teri LA, Tune LE. (1997). Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *JAMA* 278: 1363-1371.

Smith AD. (2002). Imaging the progression of Alzheimer pathology through the brain. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 99: 4135-4137.

Solas M, Aisa B, Mugueta MC, Del Río J, Tordera RM, Ramírez MJ. (2010). Interactions between age, stress and insulin on cognition: implications for Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacology* 35: 1664-1673.

Song L, Che W, Min-Wei W, Murakami Y, Matsumoto K. (2006). Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 83: 186-193.

Sotiropoulos I, Catania C, Pinto LG, Silva R, Pollerberg GE, Takashima A, Sousa N, Almeida OF. (2011). Stress acts cumulatively to precipitate Alzheimer's disease-like Tau pathology and cognitive deficits. *Journal of Neuroscience* 31: 7840-7847.

Sparks DL, Sabbagh MN, Connor DJ, Lopez J, Launer LJ, Browne P, Wasser D, Johnson-Traver S, Lochhead J, Ziolkowski C. (2005). Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results. *Archives of Neurology* 62: 753-757.

Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC 3rd, Liu H, Landers T, Gross DR. (1994). Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Experimental Neurology* 126: 88-94.

Spires T, Hyman BT. (2005). Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *Journal of American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2: 423-437.

Spiwoks-Becker I, Vollrath L, Seeliger MW, Jaissle G, Eshkind LG, Leube RE. (2001). Synaptic vesicle alterations in rod photoreceptors of synaptophysin-deficient mice. *Neuroscience* 107: 127-142.

Starkstein SE, Chemerinski E, Sabe L, Kuzis G, Petracca G, Tesón A, Leiguarda R. (1997). Prospective longitudinal study of depression and anosognosia in Alzheimer's disease. *British Journal of Psychiatry* 171: 47-52.

Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer's Disease* 7: 63-80.

Stewart R, Liolitsa D. (1999). Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. *Diabetic Medicine* 16: 93-112.

Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS, Goldstein LS. (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307: 1282-1288.

Sudhof TC. (2000). The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28: 317-320.

Sureda FX, Gutierrez-Cuesta J, Romeu M, Mulero M, Canudas AM, Camins A, Mallol J, Pallàs M. (2006). Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Experimental Gerontology* 41: 360-367.

Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Rakugi H, Morishita R. (2010). Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 7036-7041.

Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K, Hosono M, Akiguchi I, Katoh H. (1994). A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Archives of Gerontology and Geriatrics* 19: 185-192.

Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T. (1981). A new murine model of accelerated senescence. *Mechanisms of Ageing and Development* 17: 183-194.

Takeda T. (1999). Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiology of Aging* 20: 105-110.

Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R. (1996). Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 348: 429-432.

Taniguchi T, Doe N, Matsuyama S, Kitamura Y, Mori H, Saito N, Tanaka C. (2005). Transgenic mice expressing mutant (N279K) human tau show mutation dependent cognitive deficits without neurofibrillary tangle formation. *FEBS Letters* 579: 5704-5712.

Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S. (2008). New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Research Reviews* 59: 201–220.

Terry AV, Jr., Buccafusco JJ. (2003). The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306: 821-827.

Terry RD, Peck A, DeTeresa R, Schechter R, Horoupian DS. (1981). Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. *Annals of Neurology*. 10: 184-192.

Terry RD. (2000). Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 59: 1118-1119.

Tesseur I, Van Dorpe J, Spittaels K, Van den Haute C, Moechars D, Van Leuven F. (2000). Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice. *American Journal of Pathology* 156: 951-964.

Tomobe K, Nomura Y. (2009). Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence. *Neurochemical Research* 34: 660-669.

Trakas K, Oh PI, Singh S, Risebrough N, Shear NH. (2001). The health status of obese individuals in Canada. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 25: 662-668.

Tuhrim S, Levine SR. (2002). Hypertension + MRI changes = impaired cognition. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 72: 690-691.

Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. (2004). Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *BioEssays* 26: 445-453.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286: 735-741.

Vicario A, Martinez CD, Baretto D, Diaz Casale A, Nicolosi L. (2005). Hypertension and cognitive decline: impact on executive function. *Journal of Clinical Hypertension* (Greenwich) 7: 598-604.

Vinters HV. (2001). Cerebral amyloid angiopathy: a microvascular link between parenchymal and vascular dementia. *Annals of Neurology* 49: 691-692.

Wakabayashi K, Honer WG, Masliah E. (1994). Synapse alterations in the hippocampal-entorhinal formation in Alzheimer's disease with and without Lewy body disease. *Brain Research* 667: 24-32.

Walsh DM, Selkoe DJ. (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44: 181-193.

Wang J, Ho L, Chen L, Zhao Z, Zhao W, Qian X, Humala N, Seror I, Bartholomew S, Rosendorff C, Pasinetti GM. (2007). Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Clinical Investigation* 117: 3393-3402.

Weiner MF, Vobach S, Olsson K, Svetlik D, Risser RC. (1997). Cortisol secretion and Alzheimer's disease progression. *Biological Psychiatry* 42: 1030-1038.

Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 72: 1858-1862.

Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH. (2002). The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 22: 1858-1867.

Whitmer RA, Sidney S, Selby J, Johnston SC, Yaffe K. (2005). Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology* 64: 277-281.

Wiedenmann B, Franke WW. (1985). Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41: 1017-1028.

Willner P, Mitchell PJ. (2002). The validity of animal models of predisposition to depression. *Behavioural Pharmacology* 13: 169-188.

Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Hull M, Hampel H, Kessler H, Frolich L, Schroder J, Peters O, Jessen F, Luckhaus C, Perneczky R, Jahn H, Fiszer M, Maler JM, Zimmermann R, Bruckmoser R, Kornhuber J, Lewczuk P. (2007). Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not Abeta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF Abeta 40 load. *Journal of Neurochemistry* 101: 1053-1059.

Wolfe MS. (2008). Inhibition and modulation of gamma-secretase for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 5: 391-398.

Xu W, Qiu C, Winblad B, Fratiglioni L. (2007). The effect of borderline diabetes on the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Diabetes* 56: 211-216.

Yamazaki T, Koo EH, Selkoe DJ. (1996). Trafficking of cell-surface amyloid betaprotein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *Journal of Cell Science* 109: 999-1008.

Yan SD, Stern D, Kane MD, Kuo YM, Lampert HC, Roher AE. (1998). RAGE-Abeta interactions in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Restorative Neurology and Neuroscience* 12: 167-173.

Yang AJ, Chandswangbhuvana D, Shu T, Henschen A, Glabe CG. (1999). Intracellular accumulation of insoluble, newly synthesized abetan-42 in amyloid precursor protein-transfected cells that have been treated with Abeta₁₋₄₂. *Journal of Biological Chemistry* 274: 20650-20656.

Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53: 337-351.

Younkin SG. (1998). The role of Abeta 42 in Alzheimer's disease. *Journal of Physiology Paris* 92: 289-292.

Zalsman G, Aizenberg D, Sigler M, Nahshony E, Karp L, Weizman A. (2000). Increased risk for dementia in elderly psychiatric in patients with late-onset major depression. *Journal of Nervous and Mental Disease* 188: 242-243.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.

Zhong N, Scearce-Levie K, Ramaswamy G, Weisgraber KH. (2008). Apolipoprotein E4 domain interaction: synaptic and cognitive deficits in mice. *Alzheimer's & Dementia* 4: 179-192.

Zilka N, Korenova M, Novak M. (2009). Misfolded tau protein and disease modifying pathways in transgenic rodent models of human tauopathies. *Acta Neuropathologica* 118: 71-86.

Capítulo II

Capítulo 2

Planteamiento y Objetivos

Aunque gran número de trabajos han tratado de esclarecer el papel de diversos factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales, en el desarrollo de las alteraciones neuropatológicas características de la EA, la etiología de la enfermedad no se conoce con exactitud y no existen tratamientos efectivos.

De entre todas las nuevas terapias que se han desarrollado en los últimos años, y en base a los resultados obtenidos en estudios epidemiológicos, se ha propuesto que los fármacos empleados en el tratamiento de la hipertensión podrían ser potencialmente útiles en la terapia de la EA (Hanon y col., 2006; Khachaturian y col., 2006; Peila y col., 2006). Sin embargo, existen también estudios que no apoyan la eficacia de los fármacos antihipertensivos en la EA (Prince y col., 1998; In't Veld y col., 2001; Lithell y col., 2004). Por lo tanto, en la actualidad existe una cierta controversia en cuanto a su utilidad para el tratamiento de la EA. Esta ausencia de consenso puede deberse a la existencia de efectos diferenciales entre los fármacos antihipertensivos para actuar sobre los marcadores etiopatogénicos en la EA.

Un trabajo de Wang y col. (2007) evaluó experimentalmente 55 fármacos antihipertensivos con distinto mecanismo de acción. Se encontró que solo 7 de ellos fueron capaces de disminuir significativamente los acúmulos de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ en cultivos primarios de neuronas cortico-hipocampales derivadas de un modelo transgénico de EA. Estos resultados permiten sugerir que algunos fármacos antihipertensivos podrían influir en la EA a través de mecanismos que afectan a la neuropatología β -amiloide.

En base a estas premisas, en el presente trabajo se pretende estudiar cómo algunos fármacos antihipertensivos pueden actuar sobre la EA, a través de mecanismos que afectan a la proteína β -amiloide independientemente de su actividad antihipertensiva. En concreto, se estudiará el propranolol, un antagonista β -adrenérgico que se utiliza habitualmente en el tratamiento de la hipertensión, arritmia cardiaca, angina de pecho o ansiedad aguda. Se ha demostrado experimentalmente que este fármaco es capaz de revertir el déficit cognitivo asociado al estrés y niveles elevados de glucocorticoides (Roosendaal y col., 2004; Aisa y col., 2007) y de disminuir los niveles de $A\beta$ *in vitro* (Wang y col., 2007). Por lo tanto, se propone que el propranolol, a dosis más bajas que las utilizadas

como antihipertensivo, podría mejorar el deterioro cognitivo y la patología amiloide de la EA.

El objetivo general del presente trabajo es estudiar los efectos del propranolol en distintos modelos experimentales de EA. Debido a que hasta ahora no se ha conseguido un buen modelo experimental que recopile todas las características de la enfermedad, en el presente trabajo se emplearon 3 modelos experimentales distintos de EA:

- 1.** Un modelo de envejecimiento (modelo de los ratones SAMP8).
- 2.** Un modelo genético (modelo transgénico Tg2576).
- 3.** Un modelo de factor de riesgo ambiental (modelo de estrés por elevación de los niveles de glucocorticoides).

En todos los casos, los parámetros que se van a valorar son:

- 1.** El estado cognitivo.
- 2.** Marcadores de EA: niveles de A β . Mecanismos implicados: producción (BACE1) y aclaramiento (IDE) de A β .
- 3.** Marcadores de EA: estado de fosforilación de Tau. Actividad de quinasas asociadas a su fosforilación (JNK1 y GSK-3 β).
- 4.** Marcadores de plasticidad sináptica: BDNF y sinaptofisina.

Bibliografía

Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32: 256-266.

Hanon O, Pequignot R, Seux ML, Lenoir H, Bune A, Rigaud AS, Forette F, Girerd X. (2006). Relationship between antihypertensive drug therapy and cognitive function in elderly hypertensive patients with memory complaints. *Journal of Hypertension* 24: 2101-2107.

in't Veld BA, Ruitenberg A, Hofman A, Stricker BH, Breteler MM. (2001). Antihypertensive drugs and incidence of dementia: the Rotterdam Study. *Neurobiology of Aging* 22: 407-412.

Khachaturian AS, Zandi PP, Lyketsos CG, Hayden KM, Skoog I, Norton MC, Tschanz JT, Mayer LS, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC. (2006). Antihypertensive medication use and incident Alzheimer disease: the Cache County Study. *Archives of Neurology* 63: 686-692.

Lithell H, Hansson L, Skoog I, Elmfeldt D, Hofman A, Olofsson B, Trenkwalder P, Zanchetti A; SCOPE Study Group. (2004). The Study on COgnition and Prognosis in the Elderly (SCOPE); outcomes in patients not receiving add-on therapy after randomization. *Journal of Hypertension* 22: 1605-1612.

Peila R, White LR, Masaki K, Petrovitch H, Launer LJ. (2006). Reducing the risk of dementia: efficacy of long-term treatment of hypertension. *Stroke* 37: 1165-1170.

Prince M, Rabe-Hesketh S, Brennan P. (1998). Do antiarthritic drugs decrease the risk for cognitive decline? An analysis based on data from the MRC treatment trial of hypertension in older adults. *Neurology* 50: 374-379.

Roosendaal B, Hahn EL, Nathan SV, de Quervain DJ, McGaugh JL. (2004). Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. *Journal of Neuroscience* 24: 8161-8169.

Wang J, Ho L, Chen L, Zhao Z, Zhao W, Qian X, Humala N, Seror I, Bartholomew S, Rosendorff C, Pasinetti GM. (2007). Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Clinical Investigation* 117: 3393-3402.

Capítulo III

Chapter 3

**Propranolol restores cognitive deficits and improves amyloid
and Tau pathologies in a senescence-accelerated mouse
model**

Resumen

La edad está asociada con el deterioro de la función cognitiva y con un aumento del riesgo de padecer desórdenes neurodegenerativos. La hipertensión es el factor de riesgo modificable más frecuente de morbilidad cardiovascular y mortalidad a nivel mundial, y datos clínicos sugieren que es, además, un factor de riesgo para la EA.

En el presente estudio se evaluó si el propranolol podría ser capaz de mejorar el deterioro cognitivo y el aumento de los marcadores relacionados con la EA que muestran los ratones de un modelo animal de envejecimiento acelerado (SAMP8). La administración de propranolol (5 mg/kg durante 3 semanas) a los ratones SAMP8 de 6 meses de edad fue capaz de mejorar el déficit cognitivo mostrado por estos animales en la prueba de reconocimiento del nuevo objeto. En el hipocampo de estos ratones se han encontrado aumentos de los niveles de $A\beta_{42}$, que constituyen el componente principal de las placas observadas en la EA, acompañados por un aumento de la expresión de la enzima β -secretasa (BACE1) y una disminución de la enzima degradadora de insulina (IDE). Todos estos efectos se vieron revertidos por el tratamiento crónico con propranolol. Además, la hiperfosforilación de Tau (en el epítipo PHF1) que muestran los ratones SAMP8 a esta edad se vio disminuida también en el hipocampo de los ratones tratados con propranolol, un efecto debido posiblemente a una disminución de la expresión de JNK1. Además, el propranolol también aumentó la fosforilación de Akt en los ratones SAMP8, lo cual está relacionado con un aumento de la fosforilación de la enzima GSK3 β (forma inactiva), contribuyendo por tanto a la reducción de la hiperfosforilación de Tau. La patología sináptica en los ratones SAMP8, reflejada en los descensos de sinaptofisina y BDNF, fue también contrarrestada por el tratamiento con propranolol. Se propone que el propranolol podría ser beneficioso para la disfunción cerebral relacionada con la edad, y podría ser un potencial candidato para el tratamiento de diferentes enfermedades neurodegenerativas.

Abstract

Aging is associated with a deterioration of cognitive performance and with increased risk of neurodegenerative disorders. Hypertension is the most-prevalent modifiable risk factor for cardiovascular morbidity and mortality worldwide, and clinical data suggest that hypertension is a risk factor for Alzheimer's disease (AD). In the present study we tested whether propranolol could ameliorate the cognitive impairments and increases in AD-related markers shown by the senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8). Propranolol administration (5 mg/kg for 3 weeks) to 6-month-old SAMP8 mice attenuated cognitive memory impairments shown by these mice in the novel object recognition test. In the hippocampus of SAMP8 mice it has been found increases in A β ₄₂ levels, the principal constituent of amyloid plaques observed in AD, accompanied by both an increased expression of the cleaving enzyme BACE1 and a decreased expression of the degrading enzyme IDE. All these effects were reversed by propranolol treatment. Tau hyperphosphorylation (PHF-1 epitope) shown by SAMP8 mice at this age was also decreased in the hippocampus of propranolol-treated mice, an effect probably related to a decrease in JNK1 expression. Interestingly, propranolol also phosphorylated Akt in SAMP8 mice, which was associated with an increase of glycogen synthase kinase-3 β phosphorylation, contributing therefore to the reductions in Tau hyperphosphorylation. Synaptic pathology in SAMP8 mice, as shown by decreases in synaptophysin and BDNF, was also counteracted by propranolol treatment. Overall, propranolol might be beneficial in age-related brain dysfunction and could be an emerging candidate for the treatment of other neurodegenerative diseases.

Keywords:

Aging; A β levels; IDE; BACE1; JNK1; hippocampus; SAMP8

1. Introduction

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

Besides ageing, which is the most obvious risk factor for the AD, clinical data suggest that hypertension is a risk factor for AD (Luchsinger et al., 2005). Hypertension is the most-prevalent modifiable risk factor for cardiovascular morbidity and mortality worldwide. Hypertension is highly prevalent among older adults (≥ 65 years), and aging of the population will substantially increase the prevalence of this condition (Pimenta and Oparil, 2012). Antihypertensive treatments have been associated with lower incidence of clinically diagnosed AD and better cognitive function (Guo et al., 1999; Hajjar et al., 2005; Hoffman et al., 2009; Khachaturian et al., 2006). Propranolol, a β -adrenergic antagonist that is commonly used in the treatment of hypertension, cardiac arrhythmia, angina pectoris or acute anxiety, has been shown experimentally to reverse cognitive deficits associated to stress (Aisa et al., 2007; Roozental et al., 2004). Furthermore, recent evidence suggests that propranolol is able to decrease A β levels *in vitro* (Wang et al., 2007).

The senescence-accelerated mouse (SAM) is comprised of 14 different strains derived from selective inbreeding of the AKR/J strain (Takeda et al., 1981). One of these substrains, the senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) strain manifests irreversible advancing senescence and shares similar characteristics with aged humans such as a reduced lifespan, lordosis, hair loss, and reduced physical activity (Hamamoto et al., 1984; Takeda et al., 1994), whereas the senescence-accelerated mice resistant-1 (SAMR1) strain presents a normal aging pattern (Takeda, 1999). Interestingly, SAMP8 mice also exhibit age-related learning and memory deficits, as well as amyloid-like deposits in the brain (Del Valle et al., 2010; Tomobe and Nomura, 2009) and increased expression of

hyperphosphorylated Tau (Canudas et al., 2005; Orejana et al., 2011). Given such features, SAMP8 mice have been proposed as suitable rodent model for studying age-associated pathologies (Tomobe and Nomura, 2009), or even as an AD animal model (Liu et al., 2010; Pallas et al., 2008).

The aim of the present study was to explore whether propranolol could reverse the memory impairments shown by SAMP8 mice as well as the underlying mechanisms. In particular, it is hypothesised here that propranolol treatment may protect from amyloid, Tau and synaptic pathology present in the SAMP8 model of accelerated ageing. Therefore, in the present study it has been checked the effects of propranolol on SAMP8 mice regarding cognitive status in the novel object recognition test, A β levels mechanisms of processing (BACE1 levels) and clearance (IDE expression), phosphorylation of tau and kinases implicated (JNK1 and GSK3 β) and markers of synaptic plasticity (synaptophysin and BDNF levels).

2. Material and Methods

2.1 Animals

Experiments were carried out in 16 male SAMP8 and 16 SAMR1 mice (30–35 g, 6 months old at the beginning of treatment). A pilot study was also carried out in 16 male SAMP8 and 16 SAMR1 mice (31–35 g, 9 months old at the beginning of treatment). Animals were obtained from Harlan (Harlan Iberica, Barcelona, Spain). Animals were housed (5 per cage) in constant conditions of humidity and temperature (22 ± 1 °C) with a 12-hour/12 hour light-dark cycle (lights on at 7:00 hours). Food and water were available ad libitum. All the procedures followed in this work were in compliance with the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and were approved by the Ethical Committee of the University of Navarra. All efforts were made to minimise animal suffering, and to reduce the number of animals. Behavioral experiments were conducted between 9:00 a.m. and 1:00 p.m. Animals were randomly assigned to control and treatment groups (n= 8 per group age, genotype and treatment).

2.2 Drug treatment and experimental design

To study the effect of propranolol on cognitive impairment, SAMP8 and SAMR1 mice were treated once daily with propranolol (5 mg/kg i.p.) or saline for 3 consecutive weeks.

Based on the fact that the recommended dose of propranolol for the treatment of hypertension in humans is 160–320 mg/day, and using FDA criteria ([human equivalent dose in mg/kg = animal dose in mg/kg × (animal weight in kg/human weight in kg)^{0.33}] <http://www.fda.gov/cber/gdlns/dose.htm>) and formula described by Reagan-Shaw et al. (2007) for converting drug equivalent dosages across species area [human equivalent dose in mg/kg = animal dose in mg/kg × Km mice (=3) / Km human (=37)], it can be calculated that the dose used in the present study is below the recommended human equivalent dosage range.

2.3 Behavioural experiments

After three weeks of treatment, and during two consecutive days, behavioral experiments were conducted between 9:00 a.m. and 1:00 p.m. Propranolol was administered 20 h before any behavioural test.

2.3.1 Locomotor activity

Horizontal locomotor activity was measured for 30 min in an open field, which consisted of four square arenas (65 x 65 x 45 cm³) made of black wood, using a video tracking system (Ethovision 3.0, Noldus Information Technology B.V., The Netherlands), in a softly illuminated room. Total path length (cm) was analysed.

2.3.2 Novel Object Recognition Test

The novel object recognition test (NORT) was adapted from Ennaceur and Delacour (1988). The open field consisted of a square open field (65 x 65 x 45 cm³) made of black wood. During the first trial of the experiment (sample trial), two objects (prisms, conical tubes weighted with colored sand or small objects were constructed using Lego® blocks) similar in shape, size, colour, texture, etc., equidistant from the sides (10 cm) were placed within the chamber. The animal was placed into the centre of the open-field and allowed

to freely explore for 5 min. It was considered that the animal was exploring the object when the head of the mice was oriented toward the object with its nose within 2 cm of the object. One hour later a second trial (test trial) took place, in which one object was replaced by a different one, and exploration was scored for 5 min. In order to eliminate olfactory stimuli, chamber and objects were cleaned after testing each animal. To avoid preference for one of the objects, the order of the objects was balance between testing animals. Results were expressed as percentage of time spent with the novel object with respect to the total exploration time (discrimination index).

2.4 Biochemical measurements

2.4.1 Tissue and blood collection

Fasting mice were sacrificed by decapitation between 8:00 and 10:00 am. Brains were removed and dissected on dry ice to obtain the hippocampus. Trunk blood was placed in EDTA tubes, centrifuged at 12,500 g (15 min, 4° C), and plasma was frozen until insulin levels were determined.

2.4.2 Western blotting

Total extract preparations from the hippocampus of mice were homogenized in a Tris buffer (pH 7.2, 4°C) of the following composition: Tris 50mM HCl (Trizma® hydrochloride, Sigma, St. Louis, MO, USA), NaCl 150 mM (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1% Nonidet P-40 (Roche), EGTA 150 mM (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1:100 inhibitor proteases and phosphatases cocktail (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche). After a 13000 rpm centrifugation (20 min), the pellet was discarded and protein levels were measured by the Bradford method in the supernatant (cytosolic fraction). Samples (20 µg of protein) were separated by electrophoresis on a sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel. Membranes were probed overnight at 4 °C with the corresponding primary antibodies (Table 1).

Table 1. Conditions used in Western blotting experiments

Protein	Molecular weight	SDS gel	Primary Antibody (dilution)
IDE	100	13 %	Anti-IDE (1:1000) ^a
pAkt	60	13 %	Anti-pAkt Ser473 (1:1000) ^b
Total Akt	60	13 %	Anti-Akt (1:1000) ^b
Synaptophysin	38	13 %	Anti-Synaptophysin (1:1000) ^a
BACE 1	70	13 %	Anti BACE 1 (1:1000) ^a
pJNK	46	13 %	Anti-pSAPK/JNK Thr183/Tyr185 (1:2000) ^b
Total JNK	46	13 %	Anti-SAPK/JNK (1:2000) ^b
pTau	50	13 %	Anti-pTau Ser202/Thr205 AT8 (1:1000) ^c
PHF1	62	13 %	Anti-PHF1-Tau (1:3000) ^a
Total Tau	50	13 %	Anti-Tau T46 (1:2000) ^d
pGSK3 β	46	13 %	Anti-pGSK3 β Ser9 (1:1000) ^b
Total GSK3 β	46	13 %	Anti-GSK3 β (1:500) ^b
APP C-terminal	100	7,5 %	Anti-APP C-terminal (676-695) (1:2000) ^d
BDNF	28	10 %	Anti-mBDNF (1:1000) ^a
proBDNF	14	10 %	Anti-proBDNF (1:1000) ^a

Abbreviations: APP C-terminal, carboxy-terminal fragments; IDE, insulin degrading enzyme. Source of antibodies: ^aAbcam, Cambridge, MA, USA; ^bCell Signaling Technology, Beverly, MA, USA; ^cPierce, Rockford, IL, USA; ^dSigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

Immunopositive bands were visualized using an enhanced chemiluminescence western blotting-detection reagent (ECL; Amersham, Buckinghamshire, England). The optical density (O.D.) of reactive bands visible on X-ray film was determined densitometrically. β -actin or α -tubulin were used as internal controls. Results were expressed as percentage of O.D. values of control SAMR1 saline-treated mice.

2.4.3 Insulin levels

Insulin was measured in 10 μ l plasma samples using the Sensitive Mouse Insulin enzymeimmunoassay Kit (EZRMI-13K, Millipore, Billerica, MA).

2.4.4 A β levels

A β levels were determined with BC05 antibody, specific for the C-terminal of A β ₄₂, using a commercially available high-sensitive ELISA kit (Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan) following manufacturer instructions.

2.5 Data analysis and statistics

Data were analysed by SPSS for Windows, release 15.0. Normality was checked by Shapiro-Wilks's test ($p > 0.05$). Behavioural and biochemical data were analysed by two-way analysis of variance ANOVA (strain*treatment), followed by Student's t-test adjusted by Bonferroni correction. Data are presented as mean \pm SEM. The level of significance for all analyses was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Effect of propranolol treatment on memory deficits in SAMP8

Two-way ANOVA indicated a significant interaction between strain and treatment on the measure of discrimination between new and familiar objects ($F_{1,31}=7.166$, $p < 0.05$; $n=8$). Further analysis revealed that SAMP8 animals showed a significant memory impairment (Student's t-test, $p < 0.01$) that was reversed by propranolol treatment (Student's t-test, $p < 0.05$) (Figure 1a).

The effects observed in NORT do not seem to be associated to differences in locomotor activity, as total distance travelled in the open field (Table 2) was not affected by either strain ($F_{1,31} = 1.703$, $p = 0.203$) or treatment ($F_{1,31} = 2.115$, $p = 0.301$). In addition, as shown in Table 2, there was no difference in the discrimination index in the sample trial in the NORT associated to strain ($F_{1,31}=0.75$, $p=0.387$) or treatment ($F_{1,31}=0.16$, $p=0.692$). Total amount of time spent in exploring in the NORT was similar between groups in the

sample trial (Table 2, ($F_{1,31}=1.96$, $p=0.172$ associated to strain, $F_{1,31}=0.634$, $p=0.433$ associated to treatment).

Table 2. Locomotor activity and exploration time and object preference in the sample phase of the novel object recognition test (NORT).

	Locomotor activity (cm)	Total exploration time (s)	Discrimination index
6 months			
SAMR1 Saline	5715,57±1734,42	60,10±7,12	54,02±6,96
SAMR1 Propranolol	5807,33±1719,61	57,49±3,02	53,62±3,82
SAMP8 Saline	6081,14±1485,43	67,31±8,17	52,87±4,21
SAMP8 Propranolol	5236,46±1732,32	57,04±12,13	51,02±4,53
9 months			
SAMR1 Saline	5087,66±1025,71	23,92±3,45	46,30±5,07
SAMR1 Propranolol	4715,05±1464,46	28,27±4,18	51,82±3,93
SAMP8 Saline	4085,59±1433,18	27,43±5,07	52,26±4,76
SAMP8 Propranolol	4630,59±1310,17	28,32±3,64	45,055±3,52

Discrimination index: time exploring one of the objects/total exploration time x 100. There were no significant differences (two-way ANOVA strain*treatment) in any of the measurements.

As it has been showing that drastic memory deficits comparing SAMR1 and SAMP8 mice could be observed in older animals, the effects of propranolol in the NORT were also tested in a pilot experiment in 9 months old mice. A significant interaction between strain and treatment on the discrimination index in the NORT was found ($F_{1,31}=3.404$, $p<0.05$, $n=8$). Further analysis revealed a significant memory deficit in older SAP8 mice (Student's t-test, $p<0.01$) that was reversed by propranolol treatment (Student's t-test, $p<0.05$) (Figure 1b). Again, these effects observed in NORT do not seem to be associated to differences in locomotor activity, as total distance travelled in the open field ($F_{1,31} = 1.097$, $p = 0.306$ for strain, $F_{1,31} = 0.028$, $p = 0.869$ for treatment), discrimination index in the sample trial ($F_{1,31} = 0.058$, $p = 0.812$ for strain, $F_{1,31} = 0.062$, $p = 0.805$ for treatment) or total amount of time spent in exploring in the sample trial of the NORT ($F_{1,31} = 1.553$, $p = 0.272$ for strain, $F_{1,31} =$

0.096, $p = 0.759$ for treatment) was similar between groups. Regardless of treatment, total time exploring objects ($F_{1,60} = 25.115$, $p = 0.301$ for strain, $F_{1,60} < 0.000$ for age) was significantly lower in older mice. These results are shown in Table 2.

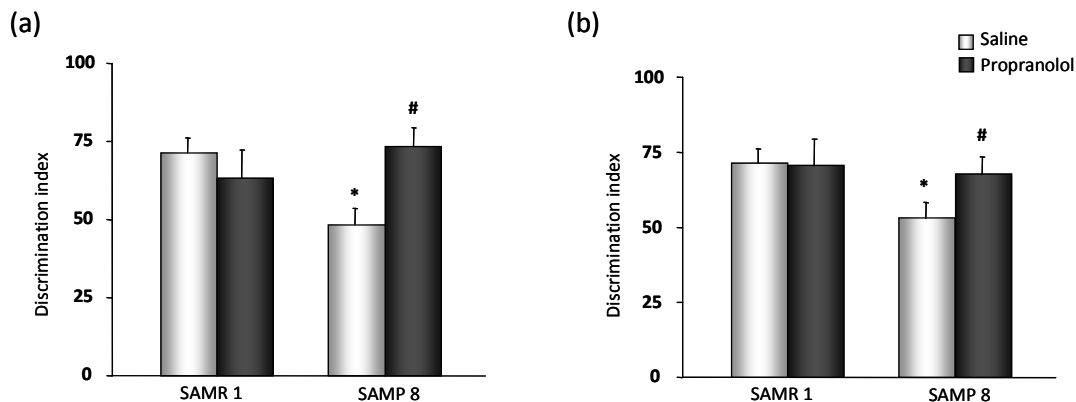


Figure 1. Effects of propranolol treatment on cognition in the NORT in 6 month old (a) and 9 months old (b) mice. Data presented as discrimination index: time exploring the new object /total exploration time x 100. Two-way ANOVA (strain x treatment), significant interaction, * $p < 0.05$ significant differences vs control (saline) SAMR1 mice, # $p < 0.05$ significant differences vs control (saline) SAMP8 mice.

3.2 Effects of propranolol on A β processing and clearance

SAMP8 mice exhibited significantly higher hippocampal levels of A β_{42} (two-way ANOVA, significant interaction $F_{1,27}=4.686$, $p < 0.05$; $n=6-8$; Student's t-test, $p < 0.05$, Figure 2a) and this effect was reversed by propranolol treatment (Student's t-test, $p < 0.05$). These increases in A β were not related to an increase in APP protein levels (two-way ANOVA, $F_{1,27}=1.998$, $p > 0.05$; $n=6-8$, Figure 2b). Levels of BACE1, the β -secretase responsible for the cleavage of APP to form A β , were significantly increased in the hippocampus of SAMP8 mice (two-way ANOVA, $F_{1,27}=5.264$, $p < 0.05$; $n=6-8$). Further analysis showed that propranolol was able to reverse this increase (Student's t-test, $p < 0.05$, Figure 2c).

On the other hand, as shown in Figure 2d, the expression of IDE, a metalloprotease that plays a crucial role in A β clearance in the brain, was significantly lower in SAMP8 mice [main effect of strain ($F_{1,27}=5.812$, $p < 0.05$; $n=6-8$)], and propranolol treatment was able to increase IDE expression [main effect of treatment ($F_{1,27}=4.851$, $p < 0.05$; $n=6-8$). Insulin levels were also measured as one of the key factors regulating IDE expression. No differences in plasmatic insulin levels among groups were detected. Levels of insulin in

plasma were as follows: 3.32 ± 0.48 for SAMR1, 3.50 ± 0.98 for SAMR1 propranolol, 3.49 ± 1.03 for SAMP8 and 2.81 ± 1.03 for SAMP8 propranolol.

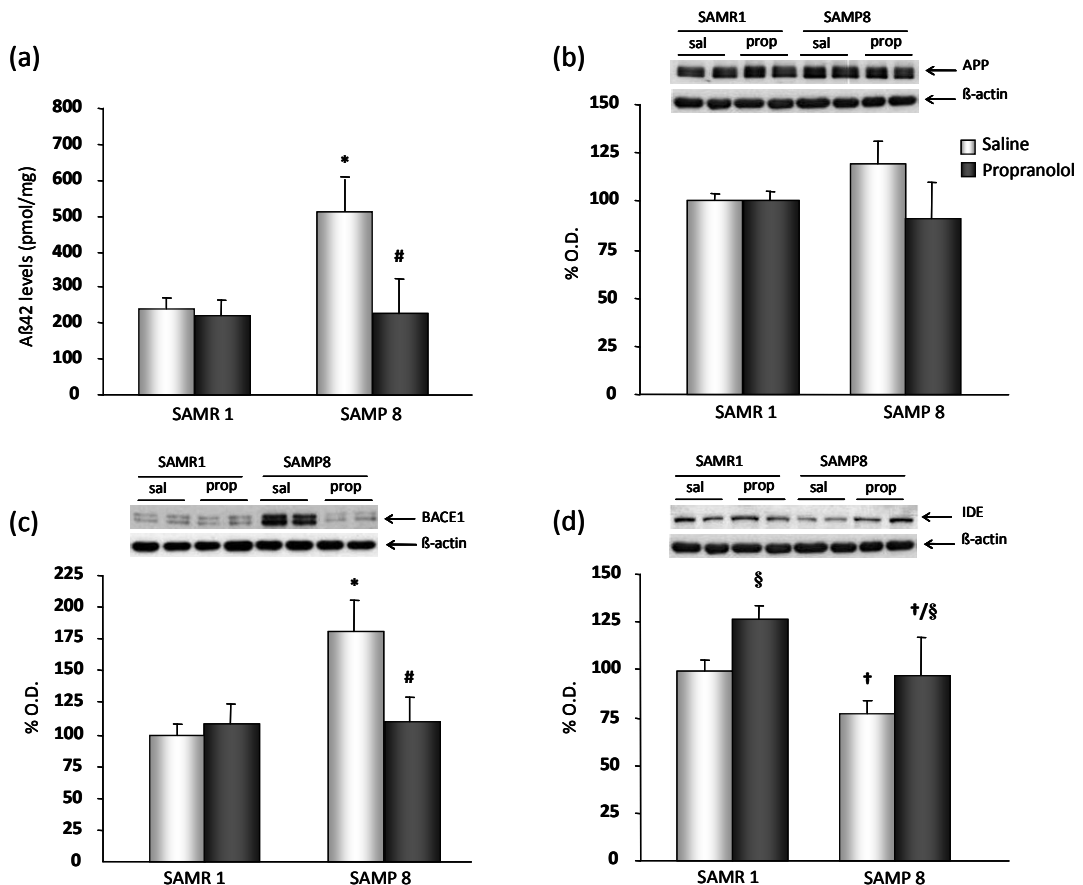


Figure 2. Effects of propranolol on A β processing and clearance. (a) A β levels (pmol/mg); (b) APP protein levels (105 kDa) levels; (c) BACE1 levels (70 kDa) ; (d) IDE levels (110 kDa) levels. Panels b, c and d show percentage of optical density (O.D.) values of control (saline) SAMR1 mice and representative picture of blotting. Statistical analysis by two-way ANOVA (strain x treatment), * p<0.05 interaction, significant differences vs control (saline) SAMR1 mice, # p<0.05 interaction, significant differences vs control (saline) SAMP8 mice, † p<0.05 main effect of strain, § p<0.05 main effect of treatment.

3.3 Effects of propranolol on Tau pathology

Immunoblot analysis showed that SAMP8 mice displayed hyperphosphorylation of Tau at pSer396/404, using the PHF-1 antibody (pTau normalized to total Tau levels) [two-way ANOVA, main effect of strain, $F_{1,27}=4.304$, $p<0.05$; $n=6-8$] and propranolol treatment

was able to decrease this phosphorylation (main effect of treatment $F_{1,27}=5.806$, $p<0.05$; $n=6-8$) (Figure 3a).

The expression of several kinases implicated in Tau pathology was checked. As shown in Figure 3b, there was an interaction between strain and treatment (two-way ANOVA, $F_{1,27}=9.593$, $p<0.01$; $n=6-8$) regarding to phosphorylated JNK1 levels (pJNK1) normalized to total JNK. Western blot analysis revealed that pJNK1 levels were significantly increased in saline SAMP8 mice compared with SAMR1 mice (Student's t-test, $p<0.05$). Importantly, propranolol treatment was able to reverse these effects on pJNK1 expression (Student's t-test, $p<0.05$).

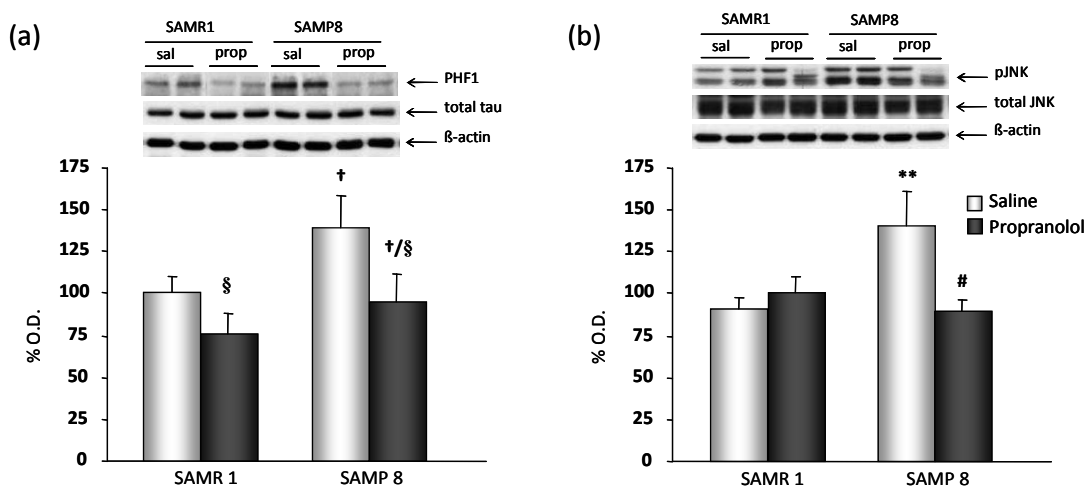


Figure 3. Effects of propranolol on Tau pathology. (a) Phosphorylated Tau at Ser396 and Ser404 levels (PHF-1 62 kDa) normalized to total Tau, (b) Phosphorylated JNK1 levels (active form 46-54 kDa) normalized to total JNK. Each panel shows percentage of optical density (O.D.) values of control (saline) SAMR1 mice and representative picture of the blotting. Statistical analysis by two way ANOVA (strain x treatment) * $p<0.01$ interaction, significant differences vs control (saline) SAMR1 mice, # $p<0.05$ interaction, significant differences vs control (saline) SAMP8 mice, † main effect of strain, § $p<0.05$ main effect of treatment.

Moreover, propranolol treatment was able to increase the expression of phosphorylated GSK3 β (pGSK3 β in Ser9) normalized to total GSK3 β (two-way ANOVA, main effect of treatment, $F_{1,27}=7.945$, $p<0.05$; $n=6-8$) (Figure 4a). Levels of pAkt were also measured, as GSK3 β phosphorylated at Ser9 is a downstream target of activated Akt (pAkt). There was a significant interaction (two-way ANOVA, $F_{1,27}=5.652$, $p<0.05$; $n=6-8$) between strain and treatment in pAkt expression normalized to total Akt (Figure 4b). Further

analysis revealed that SAMP8 mice showed a significant decrease in pAkt expression (Student's t-test, $p < 0.01$) that was reversed by propranolol treatment (Student's t-test, $p < 0.05$).

Consistent with a post-transcriptional regulation of these enzymes, total Tau, JNK1, GSK3 β and Akt levels, normalized using actin, remained unaltered. Altogether these data suggest that in SAMP8 mice, propranolol induces a reduction in pTau probably through the modulation of JNK1 and Akt/GSK3 β pathways.

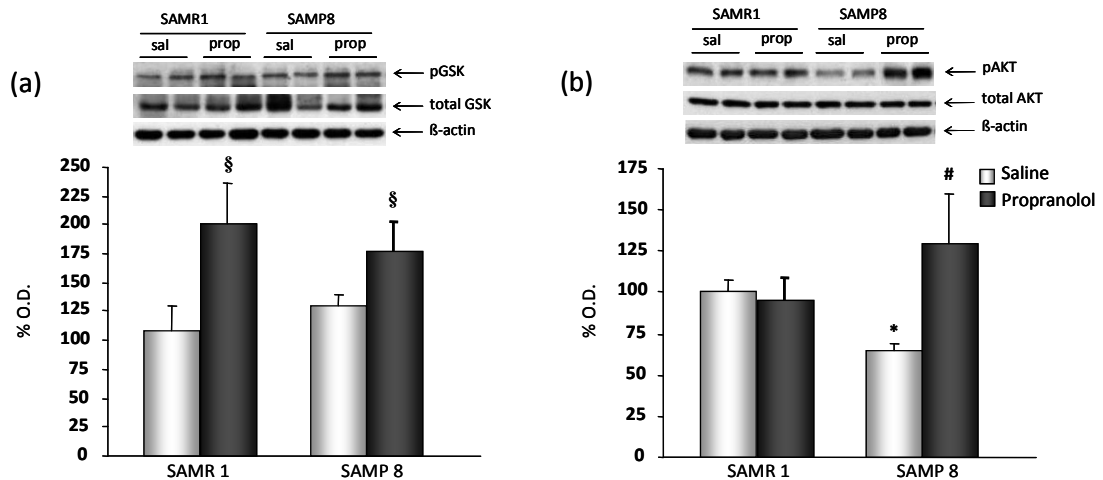


Figure 4. Effects of propranolol on Tau pathology. (a) Phosphorylated GSK3 β levels (inactive form 46 kDa) normalized to total GSK3 β ; (b) Phosphorylated Akt levels (active form of the enzyme, 60kDa) normalized to total Akt. Each panel shows percentage of optical density (O.D.) values of control (saline) SAMR1 mice and representative picture of the blotting. Statistical analysis by two way ANOVA (strain x treatment) * $p < 0.01$ interaction, significant differences vs control (saline) SAMR1 mice, # $p < 0.05$ interaction, significant differences vs control (saline) SAMP8 mice, § $p < 0.05$ main effect of treatment.

3.4 Effects of propranolol on synaptic plasticity

Changes in the expression of plasticity markers could represent one of the main mechanisms which could account for cognitive disturbances observed in SAMP8 mice.

Synaptophysin is a widely used marker to estimate synaptic density (Valtorta y col., 2004). There was an interaction (two-way ANOVA, $F_{1,27}=8.108$, $p < 0.01$; $n=6-8$) between strain and treatment in synaptophysin levels. SAMP8 animals showed a significant

decrease in synaptophysin levels (Student's t-test; $p < 0.01$) that was reversed by propranolol treatment (Student's t-test, $p < 0.05$) (Figure 5a).

The neurotrophic factor BDNF helps the survival of existing neurons, facilitates the growth of new neurons and synapses, and low BDNF levels are associated with cognitive deficits. Decreased BDNF levels (mature, mBDNF) were found associated to strain ($F_{1,25} = 7.727$, $p < 0.05$; $n = 6-8$), while propranolol treatment increased mBDNF expression ($F_{1,25} = 5.370$, $p < 0.05$; $n = 6-8$). BDNF is secreted to the extracellular matrix in a proBDNF form, which negatively affects survival and synaptic plasticity. However, proBDNF is mainly cleaved to mature BDNF, which eventually has positive effects on survival, growth, synaptic plasticity and memory formation. Therefore, the ratio proBDNF/mBDNF has been measured (Figure 5b). There was a significant interaction between strain and treatment (two-way ANOVA, $F_{1,27} = 5.221$, $p < 0.05$; $n = 6-8$), and a significant decrease in the proBDNF/mBDNF ratio was found in SAMP8 mice (Student's t-test; $p < 0.01$) that was reversed by propranolol treatment (Student's t-test, $p < 0.05$).

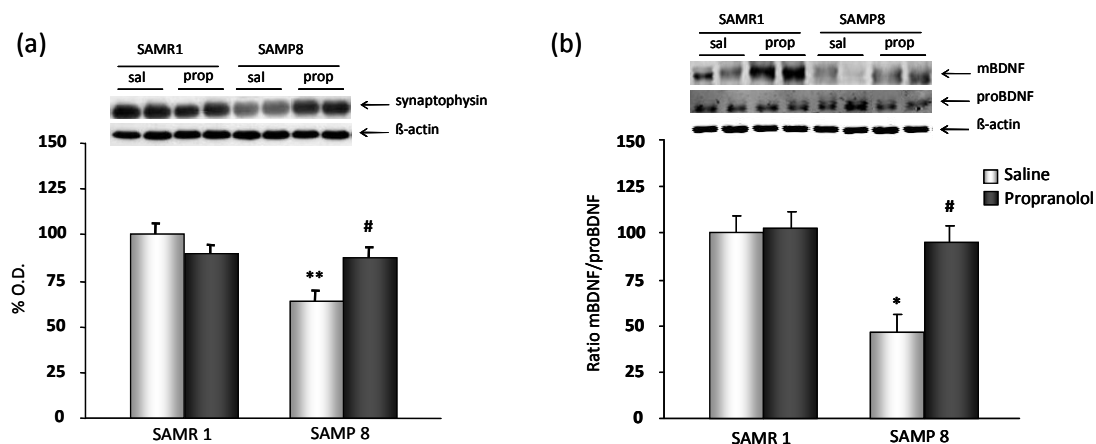


Figure 5. Effects of propranolol on synaptic plasticity. (a) Synaptophysin levels (38 kDa) levels; (b) Ratio proBDNF to mature (m)BDNF. No differences were found in the proBDNF normalized to actin. Statistical analysis by two-way ANOVA (strain x treatment), * $p < 0.01$ interaction, significant differences vs control (saline) SAMR1 mice, # $p < 0.05$ interaction, significant differences vs control (saline) SAMP8 mice.

4. Discussion

In the present study it has been shown that propranolol, a β -adrenergic antagonist widely used as an antihypertensive drug, exerts a protective effect on memory impairments shown by SAMP8 mice in the NORT. Moreover, propranolol reversed the main neuropathological markers shown by this senescence-accelerated mouse model, such as Tau hyperphosphorylation and β -amyloid pathology. It is discussed below that these effects could be mediated by the modulation of JNK1 activity.

SAMP8 mice show at early as 5-6-month-old of age memory impairments, $A\beta$ deposition and increased Tau phosphorylation in the hippocampus when compared with age matched SAMR1 mice (Pallas et al., 2008). SAMP8 mice are considered nowadays as a robust model for studying age-associated pathologies, including AD (Liu et al., 2012; Pallas et al., 2008; Sureda et al., 2006). It has even been suggested that SAMP8 mice may more closely represent the complexity of the disease than other transgenic mouse lines because of the multifactorial nature of AD (Pang et al., 2006). As already described, 6-month-old SAMP8 mice presented learning and memory impairments in the NORT when compared with age matched SAMR1 mice, an effect that was reversed by propranolol. Previous works have reported the ability of propranolol to reverse cognitive deficits associated to deleterious insults, such as chronic stress (Aisa et al., 2007). However, to our knowledge, this is the first report describing pro-cognitive actions of propranolol in an experimental model of ageing. It is important to note that propranolol was used in the present study at a lower dose than the commonly prescribed for the treatment of hypertension in humans (Shannon et al., 2007), as calculated by the formula described by Reagan-Shaw et al. (2007). Therefore, the results presented here seem to be independent from the antihypertensive effect of propranolol. In an attempt to elucidate the mechanisms underlying the beneficial effects of propranolol we focused our study on both β -amyloid and Tau pathology, the two main pathological hallmarks in AD.

AD is characterized by the progressive accumulation in the brain of senile plaques composed of beta-amyloid protein ($A\beta$). According to the amyloid hypothesis, accumulation of $A\beta$ in the brain is the primary influence leading to AD pathogenesis, and

this accumulation it is proposed to result from an imbalance between A β production and A β clearance. Del Kumar et al. (2000) and Valle et al (2010) showed that from as early as 6 months onward, SAMP8 mice show A β deposition in the hippocampus that increases in number and extent with age. However, plaques cannot be found until the age of 18 months (Morley et al., 2000). A β protein is generated from APP, which can be cleaved by BACE1 and α -secretase to produce C99 and C83. These C-terminal fragments can then be cleaved by γ -secretase to produce A β and p3, respectively (Dhikav and Anand, 2007). In APP transgenic mice, BACE1 overexpression increases A β formation (Fukamoto et al., 2002), whereas BACE1 *knockout* mice produce little or no A β peptide (Bodendorf et al., 2002; Luo et al., 2001), indicating that BACE1 expression plays a critical role in A β peptide biosynthesis. On the other hand, the major protease involved in A β degradation in brain tissue is the insulin degrading enzyme (IDE) (Kurochkin et al., 1994; McDermott et al., 1997; Qiu et al., 1998; Vekrellis et al., 2000). It has been hypothesized that an age-associated decline in A β -degrading protease activity would contribute to A β accumulation, particularly in patients with late-onset AD. Early studies supported such a relationship and revealed reduced IDE mRNA and protein immunolabeling in AD compared with control brains (Miners et al., 2006; Russo et al., 2005; Wang et al., 2010; Akiyama et al., 2001). It has also been shown that *knockout* IDE mice present a lower degradation of A β (Farris et al., 2003). In our hands, it seems that the increased A β levels in SAMP8 mice could be derived from both an increased formation through a BACE1 up regulation and a decreased degradation associated to a lower IDE expression, and all these effects were reversed by propranolol. Supporting this hypothesis, increased levels of A β were not accompanied by changes in the expression of APP, suggesting an increased amyloidogenic processing of APP.

In addition to accumulation of A β , abnormal hyperphosphorylation of Tau is a critical event in the cascade leading to AD (Blennow et al., 2006). Tau hyperphosphorylation has been described in 5-month-old SAMP8 mice and it has been directly implicated in neurofibrillary degeneration and accelerated aging process in this senescence mouse model (Canudas et al., 2005; García-Matas et al., 2008; Sureda et al., 2006). Data based on several lines of evidence from transgenic mice and humans indicate a strong correlation between the extent of Tau pathology and cognitive dysfunction

(Arriadaga et al., 1992; Ashe and Zahs, 2010; Guillozet et al., 2003). Among kinases implicated in Tau pathology, data on activation of JNK1 seems to be of particular interest. JNK1 is a member of the MAPK family that plays a key role in neuronal plasticity, regeneration, cell death and regulation of cellular senescence (Kögel et al., 2005, Maruyama et al., 2009). Activation of JNK1 phosphorylates Tau at sites recognized by the presently used PHF-1 antibody (Bellucci et al., 2007). It is to note that JNK1 phosphorylates the insulin receptor substrate 1 (IRS1) at an inhibitory site that can block signal transduction by the insulin receptor (Sabio et al, 2008), therefore purportedly altering insulin-related intracellular pathways, namely the Akt-GSK-Tau. This Akt-GSK route is required for the induction of long-term potentiation and depression, basic processes underlying learning and memory (Van der Heide et al., 2006). Accordingly, it has been found, compared to controls, that treatment with propranolol in SAMP8 mice leads to decreased JNK1 activity accompanied by increased pAkt, increased pGSK-3 β (inactive form) and decreased pTau expression. Even more, it has been described that JNK1 mediates BACE1 upregulation (Tamagno et al., 2005; 2009). Therefore, modulation of JNK1 activity in SAMP8 mice or by propranolol treatment may explain the effects on both A β and tau pathology. However, the mechanisms by which propranolol could affect JNK1 activity remains to be elucidated.

As previously reported, SAMP8 mice displayed decreased levels of synaptophysin (Cheng et al., 2011) or BDNF (Tajes et al., 2010; Li et al., 2009), which could contribute to cognitive deficits. BDNF has been described to be highly protective for different neuronal phenotypes and can prevent neuronal cell death in different experimental paradigms *in vivo* as well as *in vitro* (Barde, 1994; Siegel and Chauhan, 2000). BDNF levels decline with age and are lower in AD brains than in those without dementia. In various mouse, rat, and primate models, BDNF therapy has reverted synaptic damage and reversed learning and memory deficits (see review by Nagahara and Tuszynski, 2011). Not only that, but synaptophysin seem to be a presynaptic vesicle protein partially regulated by BDNF (Tartaglia et al., 2001; Valtorta et al., 2004), therefore reduced synaptophysin expression may result from a reduced BDNF function. However, hippocampal BDNF is secreted to the extracellular matrix in a proBDNF form. ProBDNF is active via p75^{NTR} receptors and

negatively affects survival and synaptic plasticity. ProBDNF is mainly cleaved to mature BDNF to activate TrkB receptors, which eventually has positive effects on survival, growth, synaptic plasticity and memory formation. Therefore, the ratio proBDNF/mBDNF could be a more accurate form to anticipate BDNF outcomes. It is to note that it could have been expected that β -receptor blockade would have led to decreased BDNF levels (Flores et al., 2010). Therefore, the present increase in the ratio suggests that propranolol could modulate the cleavage of pro-BDNF to give rise to the mature form.

As final comments, it is worth mentioning that this is not the first work showing that semi-chronic 3-4 weeks treatments are enough to reverse deficits/alterations in SAMP8 mice (Orejana et al., 2012). One of the reason that could explain the success of semi-chronic treatments in reversing pathology in SAMP8 mice is the fact that this is a model of accelerated outcomes (pathology starts to show early in life) and the fact that treatment started when pathology was not so established and deleterious that it is difficult to reverse. These hypotheses are related to the currently spreading notion that diagnosis/pharmacological treatment of Alzheimer's disease starts too late in life (Haas et al., 2012). Interestingly, a pilot experiment was also performed in the present work in which propranolol was also able to reverse the cognitive deficits observed even in older (9 months old at the beginning of treatment) SAMP8 mice. At this age, the most significant memory changes between SAMR1 and SAMP8 could be observed (Pallas et al., 2008).

In summary, it is proposed here that A β -, Tau-, synaptic- and cognitive pathology in SAMP8 mice could be related to JNK1 activation, as already suggested in Tg2576/PS1 double transgenic mouse model for AD, in which the activation of JNK1 has been associated with age-dependent amyloid plaque deposition, Tau phosphorylation, and the loss of synaptophysin (Kyriakis, 1999; Pearson et al., 2006). Interestingly, all these pathological features could be reversed by propranolol treatment. Therefore, the present work could constitute the proof of concept for the use of propranolol for the treatment of pathologies associate to ageing.

References

Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32: 256-266.

Akiyama H, Kondo H, Ikeda K, Kato M, McGeer PL. (2001). Immunohistochemical localization of neprilysin in the human cerebral cortex: inverse association with vulnerability to amyloid beta-protein (A β) deposition. *Brain Research* 902: 277-281.

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42: 631-639.

Ashe KH, Zahs KR. (2010). Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* 66: 631-645.

Barde YA. (1994). Neurotrophic factors: an evolutionary perspective. *Journal of Neurobiology* 25: 1329-1333.

Barzilai N, Atzmon G, Derby CA, Bauman JM, Lipton RB. (2006). A genotype of exceptional longevity is associated with preservation of cognitive function. *Neurology* 67: 2170-2175.

Bellucci A, Rosi MC, Grossi C, Fiorentini A, Luccarini I, Casamenti F. (2007). Abnormal processing of tau in the brain of aged TgCRND8 mice. *Neurobiology of Disease* 27: 328-338.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* 368: 387-403.

Bodendorf U, Danner S, Fischer F, Stefani M, Sturchler-Pierrat C, Wiederhold KH, Staufenbiel M, Paganetti P. (2002). Expression of human beta-secretase in the mouse brain increases the steady-state level of betaamyloid. *Journal of Neurochemistry* 80: 799-806.

Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallàs M. (2005). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mechanisms of Ageing and Development* 126: 1300-1304.

Cheng XR, Yang Y, Zhou WX, Zhang YX. (2011). Expression of VGLUTs contributes to degeneration and acquisition of learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 95: 361-375.

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

Dhikav V, Anand KS. (2007). Glucocorticoids may initiate Alzheimer's disease: a potential therapeutic role for mifepristone (RU-486). *Medical Hypotheses* 68: 1088-1092.

Ennaceur A, Delacour J. (1988). A new one trial-test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research* 31: 47-59.

Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 4162-4167.

Flores O, Núñez H, Pérez H, Morgan C, Soto-Moyano R, Valladares L, Burgos H, Olivares R, Hernández A. (2010). beta-Adrenoceptor blockade depresses molecular and functional plasticities in the rat neocortex. *Brain Research Bulletin* 82: 284-288.

Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC. (2002). Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Archives of Neurology* 59: 1381-1389.

García-Matas S, Gutierrez-Cuesta J, Coto-Montes A, Rubio-Acero R, Díez-Vives C, Camins A, Pallàs M, Sanfeliu C, Cristòfol R. (2008). Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Aging Cell* 7: 630-640.

Guillozet AL, Weintraub S, Mash DC, Mesulam MM. (2003). Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Archives of Neurology* 60: 729-736.

Guo Z, Viitanen M, Winblad B, Fratiglioni L. (1999). Low blood pressure and incidence of dementia in a very old sample: dependent on initial cognition. *Journal of the American Geriatrics Society* 47: 723-726.

Hajjar I, Keown M, Frost B. (2005). Antihypertensive agents for aging patients who are at risk for cognitive dysfunction. *Current Hypertension Reports* 7: 466-473.

Hamamoto H, Honma A, Irino M, Matsushita T, Toda K, Matsumura M, Takeda T. (1984). Grading score system: A method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mechanisms of Ageing and Development* 26: 91-102.

Hoffman LB, Schmeidler J, Lesser GT, Beerl MS, Purohit DP, Grossman HT, Haroutunian V. (2009). Less Alzheimer disease neuropathology in medicated hypertensive than nonhypertensive persons. *Neurology* 72: 1720-1726.

Khachaturian AS, Zandi PP, Lyketsos CG, Hayden KM, Skoog I, Norton MC, Tschanz JT, Mayer LS, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC. (2006). Antihypertensive medication use and incident Alzheimer disease: the Cache County Study. *Archives of Neurology* 63: 686-692.

Kögel D, Schomburg R, Copanaki E, Prehn JH. (2005). Regulation of gene expression by the amyloid precursor protein: inhibition of the JNK/cJun pathway. *Cell Death & Differentiation* 12: 1-9.

Kyriakis JM. (1999). Making the connection: coupling of stress-activated ERK/MAPK (extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) core signalling modules to extracellular stimuli and biological responses. *Biochemical Society Symposia* 64: 29-48.

Li Q, Zhao HF, Zhang ZF, Liu ZG, Pei XR, Wang JB, Li Y. (2009). Long-term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing Abeta1-42 oligomers and upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus. *Neuroscience* 163: 741-749.

Liu W, Liu C, Zhu J, Shu P, Yin B, Gong Y, Qiang B, Yuan J, Peng X. (2010). MicroRNA-16 targets amyloid precursor protein to potentially modulate Alzheimer's-associated pathogenesis in SAMP8 mice. *Neurobiology of Aging* 33: 522-534.

Luchsinger JA, Reitz C, Honig LS, Tang MX, Shea S, Mayeux R. (2005). Aggregation of vascular risk factors and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology* 65: 545-551.

Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R. (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nature Neuroscience* 4: 231-232.

Maruyama J, Naguro I, Takeda K, Ichijo H. (2009). Stress-activated MAP kinase cascades in cellular senescence. *Current Medicinal Chemistry* 16, 1229-1235.

McDermott JR, Gibson AM. (1997). Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochemical Research* 22: 49-56.

Mehta PD. (2007). Amyloid beta protein as a marker or risk factor of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* 4: 359-363.

Miners JS, Van Helmond Z, Chalmers K, Wilcock G, Love S, Kehoe PG. (2006). Decreased expression and activity of neprilysin in Alzheimer disease are associated with cerebral amyloid angiopathy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 65: 1012-1021.

Orejana L, Barros-Miñones L, Jordán J, Puerta E, Aguirre N. (2011). Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model. *Neurobiology of Aging* 33: 625.e11-20.

Pallas M., Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesus G. (2008). From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *Journal of Alzheimer's Disease* 15: 615-624.

Pang KCH, Miller JP, Fortress A, McAuley D. (2006). Age-related disruptions of circadian rhythm and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM8). *Age* 28: 283-296.

Pearson AG, Byrne UT, MacGibbon GA, Faull RL, Dragunow M. (2006). Activated c-Jun is present in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. *Neuroscience Letters* 398: 246-250.

Pimenta E, Oparil S. (2012). Management of hypertension in the elderly. *Nature Reviews Cardiology* 9: 286-296.

Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *Journal of Biological Chemistry* 273: 32730-32738.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. (2007). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal* 22: 659-661.

Roosendaal B, Hahn EL, Nathan SV, de Quervain DJ, McGaugh JL. (2004). Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. *Journal of Neuroscience* 24: 8161-8169.

Russo R, Borghi R, Markesbery W, Tabaton M, Piccini A. (2005). Nellylisin decreases uniformly in Alzheimer's disease and in normal aging. *FEBS Letters* 579: 6027-6030.

Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko HJ, Barret T, Kim JK, Davis RJ. (2008). A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322: 1539-1543.

Siegel GJ, Chauhan NB. (2000). Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Research Reviews* 33: 199-227.

Sureda FX, Gutierrez-Cuesta J, Romeu M, Mulero M, Canudas AM, Camins A, Mallol J, Pallàs M. (2006). Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Experimental Gerontology* 41: 360-367.

Tajes M, Gutierrez-Cuesta J, Folch J, Ortuño-Sahagun D, Verdaguer E, Jiménez A, Junyent F, Lau A, Camins A, Pallàs M. (2010). Neuroprotective role of intermittent fasting in senescence-accelerated mice P8 (SAMP8). *Experimental Gerontology* 45: 702-710.

Takeda T. (1999). Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiology of Aging* 20: 105-110.

Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K, Hosono M, Akiguchi I, Katoh H. (1994). A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Archives of Gerontology and Geriatrics* 19: 185-192.

Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto, H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T. (1981). A new murine model of accelerated senescence. *Mechanisms of Ageing and Development* 17: 183-194.

Tamagno E, Guglielmotto M, Giliberto L, Vitali A, Borghi R, Autelli R, Danni O, Tabaton M. (2009). JNK and ERK1/2 pathways have a dual opposite effect on the expression of BACE1. *Neurobiology of Aging* 30: 1563-1573.

Tamagno E, Parola M, Bardini P, Piccini A, Borghi R, Guglielmotto M, Santoro G, Davit A, Danni O, Smith MA, Perry G, Tabaton M. (2005). Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *Journal of Neurochemistry* 92: 628-636.

Tartaglia N, Du J, Tyler WJ, Neale E, Pozzo-Miller L, Lu B. (2001). Protein synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Biological Chemistry* 276: 37585-37593.

Tomobe K, Nomura Y. (2009). Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence. *Neurochemical Research* 34: 660-669.

Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. (2004). Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *BioEssays* 26: 445-453.

van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP. (2006). Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Progress in Neurobiology* 79: 205-221.

Vekrellis K, Ye Z, Qiu WQ, Walsh D, Hartley D, Chesneau V, Rosner MR, Selkoe DJ. (2000). Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *Journal of Neuroscience* 20: 1657-1665.

Wang J, Ho L, Chen L, Zhao Z, Zhao W, Qian X, Humala N, Seror I, Bartholomew S, Rosendorff C, Pasinetti GM. (2007). Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Clinical Investigation* 117: 3393-3402.

Capítulo IV

Chapter 4

Propranolol reduces cognitive deficits, amyloid and Tau pathology in Alzheimer's transgenic mice

Resumen

La eficacia de los fármacos antihipertensivos en la EA es controvertida. En este trabajo se ha evaluado si algunos antihipertensivos podrían actuar sobre la EA mediante mecanismos independientes de su actividad antihipertensiva. Se han estudiado los efectos del tratamiento con el antihipertensivo propranolol sobre la cognición y los marcadores relacionados con la EA en el modelo animal Tg2576 de EA. El propranolol, a una dosis menor que la usada como antihipertensivo (5mg/kg, 6 semanas) es capaz de atenuar las alteraciones cognitivas mostradas por los ratones Tg2576 a los 9 meses de edad en la prueba de reconocimiento del nuevo objeto y en el test del miedo condicionado. El propranolol fue capaz de contrarrestar los niveles de $A\beta_{42}$ presentes en el hipocampo de los ratones Tg2576. Este efecto se vio acompañado por un aumento en la expresión de la enzima degradadora IDE. Cambios en marcadores de la patología sináptica, reflejada en descensos de la fosforilación de Akt y en la expresión de BDNF en los ratones Tg2576, fueron también contrarrestados por el tratamiento con propranolol. La hiperfosforilación de Tau mostrada por estos animales también disminuyó en el hipocampo de los ratones tratados con propranolol, un efecto probablemente debido a un aumento de la fosforilación de GSK-3 β (forma inactiva) y a un descenso de la expresión de JNK1. En general, estos resultados refuerzan la idea de que el propranolol podría considerarse un potencial agente terapéutico para la EA.

Abstract

The efficacy of antihypertensive agents in Alzheimer's disease (AD) is controversial. It has been tested here whether some antihypertensive drugs might influence AD through mechanisms independent of blood pressure-lowering activity. The effects of treatment with the antihypertensive propranolol on cognition and AD-related markers have been studied in the Tg2576 mouse model of AD. Propranolol, at a lower dose than that used as antihypertensive (5 mg/kg, 6 weeks), attenuated cognitive impairments shown by 9 month old Tg2576 mice in the novel object recognition and fear conditioning tests. Propranolol was also able to counteract the increases in hippocampal levels of A β ₄₂ present in Tg2576 mice. This effect was accompanied by an increased expression of the degrading enzyme IDE. Changes in markers of synaptic pathology, as shown by decreases in phosphorylation of Akt and in the expression of BDNF in Tg2676 mice, were also counteracted by propranolol treatment. Tau hyperphosphorylation shown by Tg2576 mice was also decreased in the hippocampus of propranolol-treated mice, an effect probably related to an increase of GSK-3 β phosphorylation (inactive form) and a decreased JNK1 expression. Overall, these data further strengthen the potential of propranolol as a therapeutic agent for Alzheimer's disease.

Keywords:

Antihypertensive, synaptophysin, BDNF, JNK1, IDE, BACE, Akt, GSK-3 β , risk factor



Propranolol reduces cognitive deficits, amyloid and tau pathology in Alzheimer's transgenic mice

Marta Dobarro¹, Gorka Gerenu¹ and María J Ramírez^{1,2}

¹ Dpto Farmacología, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

² Division of Neurosciences, CIMA, Pamplona, Spain

Abstract

The efficacy of antihypertensive agents in Alzheimer's disease (AD) is controversial. It has been tested here whether some antihypertensive drugs might influence AD through mechanisms independent of blood pressure-lowering activity. The effects of treatment with the antihypertensive propranolol on cognition and AD-related markers have been studied in the Tg2576 mouse model of AD. Propranolol, at a lower dose than that used as antihypertensive (5 mg/kg, 6 wk), attenuated cognitive impairments shown by Tg2576 mice aged 9 months in the novel object recognition and fear conditioning tests. Propranolol was also able to counteract the increases in hippocampal levels of $A\beta_{42}$ present in Tg2576 mice. This effect was accompanied by an increased expression of insulin degrading enzyme. Changes in markers of synaptic pathology, as shown by decreases in phosphorylation of Akt and in the expression of BDNF in Tg2676 mice, were also counteracted by propranolol treatment. Tau hyperphosphorylation shown by Tg2576 mice was also decreased in the hippocampus of propranolol-treated mice, an effect probably related to an increase of GSK3 β phosphorylation (inactive form) and a decreased JNK1 expression. Overall, these data further strengthen the potential of propranolol as a therapeutic agent for AD.

Received 19 February 2013; Reviewed 14 March 2013; Revised 5 April 2013; Accepted 9 May 2013;
First published online 17 June 2013

Key words: Antihypertensive, BACE, BDNF, insulin degrading enzyme, JNK1.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder and the first cause of dementia in the elderly (Cummings and Cole, 2002). AD is associated with progressive memory loss and cognitive impairments and at the molecular level by the presence of neurofibrillary tangles, composed of hyperphosphorylated τ fibrils and β -amyloid ($A\beta$)-containing plaques (Hardy, 2006). Loss of synapses and degeneration of the neurons are also key pathological events in AD (Selkoe, 2002). Over the last few years, several drugs such as $A\beta$ modulators, γ -secretase inhibitors, antioxidants or anti-inflammatory molecules, have emerged as potential therapeutic candidates for the treatment of AD after showing promising results in

animal models. However, none of them have proven to be effective.

Identification of risk factors of AD is important for developing therapeutic strategies. Several longitudinal studies suggest that blood pressure levels are increased decades before the onset of AD and higher blood pressure seems to accelerate the rate of cognitive decline in patients with early-onset AD (Bellew et al., 2004; Luchsinger et al., 2005; Skoog and Gustafson, 2006). Furthermore, epidemiological evidence suggests that hypertension may promote the onset and progression of $A\beta$ and τ neuropathology (Sparks et al., 1996; Petrovitch et al., 2000). Antihypertensive treatments have been associated with lower incidence of clinically diagnosed AD and better cognitive function (Hajjar et al., 2005; Khachaturian et al., 2006; Hoffman et al., 2009). For example, Guo et al. (1999) reported that the use of specific cardiovascular agents, especially β -blockers and calcium-receptor antagonists, protected elderly hypertensive subjects from developing AD. However, despite these encouraging reports, other studies failed to support the efficacy of antihypertensive

Address for correspondence: Dr M. J. Ramírez, Department Pharmacology, School of Medicine, University of Navarra, Irunlarrea 1, 31008 Pamplona, Spain.
Tel.: 34 948 425600 Fax: 34 948 425649
Email: mariaja@unav.es

agents in AD dementia (Prince et al., 1998; in't Veld et al., 2001; Lithell et al., 2004). Thus, at present there is inconsistent evidence regarding the influence of antihypertensive drugs on AD incidence and/or pathogenesis.

This lack of consensus may reflect, in part, the different AD-modifying features among antihypertensive drugs. Wang et al. (2007) performed a high-throughput screening study assessing 55 antihypertensive drugs representing all pharmacological classes of currently available antihypertensives. They found that only a few of the antihypertensive agents were able to significantly reduce the accumulation of $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ in primary embryonic cortico-hippocampal neuron cultures derived from a transgenic mouse AD model, suggesting that some antihypertensive drugs might influence AD through mechanisms affecting $A\beta$ neuropathology.

Based on this premise, the present work aims to study whether some antihypertensive drugs might influence AD through mechanisms affecting $A\beta$ neuro pathology independent of blood pressure-lowering activity. We have focussed on propranolol, a β -adrenergic antagonist that is commonly used in the treatment of hypertension, cardiac arrhythmia, angina pectoris or acute anxiety. Propranolol has been shown experimentally to reverse cognitive deficits associated with stress (Roosendaal et al., 2004; Aisa et al., 2007) and to decrease $A\beta$ levels *in vitro* (Wang et al., 2007). Propranolol has been previously used as a therapeutic agent for the treatment of disruptive behaviours (mainly aggression and agitation) in AD (Shankle et al., 1995; Peskind et al., 2005). It is proposed here that propranolol, at lower doses than those used as antihypertensive, could ameliorate memory impairments and $A\beta$ pathology in the Tg2576 transgenic mouse model of AD.

Method

Animals

Experiments were carried out in 16 female Tg2576 AD transgenic mice (23–26 g), that express the human 695-aa isoform of amyloid precursor protein (APP) containing the Swedish double mutation [APP^{swe}; (APP695) Lys⁶⁷⁰→Asn, Met⁶⁷¹→Leu]. The mice were on an inbred C57BL/6/SJL genetic background. In the Tg2576 AD mouse model, $A\beta$ peptide content in the brain accumulates exponentially between ages 7 and 12 months (Hsiao et al., 1996). As our hypothesis is that propranolol is able to interfere with $A\beta$ pathology, mice aged 8 months have been used. As a control we

used a group of 16 age- and strain-matched non-transgenic mice. Animals were housed (five per cage) in constant conditions of humidity and temperature ($22\pm 1^\circ\text{C}$) with a 12-h/12-h light–dark cycle (lights on 07:00 hours). Food and water were available *ad libitum*. All the procedures followed in this work were in compliance with the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and were approved by the Ethical Committee of the University of Navarra. Behavioural experiments were conducted between 09:00 and 13:00 hours. Animals were randomly assigned to control and treatment group.

Drug treatment and experimental design

To study the effect of propranolol (propranolol hydrochloride; Sigma-Aldrich, USA) on cognitive impairment, female Tg2576 mice aged 8 months and their respective controls (non-transgenic mice), were treated once daily with propranolol (5 mg/kg i.p.) or saline for 6 consecutive wk ($n=8$ per genotype and treatment).

In the final week of treatment the novel object recognition test (NORT) and the fear conditioning test were performed. During the behavioural studies, to avoid any purported effect of an acute drug administration, propranolol was administered after the behavioural testing (20 h before the following behavioural session).

Behavioural tests

Behavioural experiments were conducted between 09:00 and 13:00 hours. Animals were randomly assigned to control and treatment group. Tg2576 mice aged 9 months have shown impairments in recognition memory, but spatial working memory is not altered (Hsiao et al., 1996; Reed et al., 2010). Therefore, the tests chosen to study the effects of propranolol on cognition have been the NORT and fear conditioning.

Locomotor activity

Horizontal locomotor activity was measured for 30 min in an open field, which consisted of four square arenas ($40\times 50\times 50$ cm) using a video tracking system (Ethovision 3.0; Noldus Information Technology BV, The Netherlands), in a softly illuminated room. Total path length (cm) was analysed.

Object recognition

The object recognition test was adapted from Ennaceur and Delacour (1988). The open field consisted of a square open field ($40\times 50\times 50$ cm). During the first trial of the experiment, two objects similar in shape,

size, colour, texture etc., equidistant from the sides (10 cm) were placed within the chamber. The animal was placed into the centre of the open field and allowed to freely explore for 5 min. It was considered that the animal was exploring the object when the head of the mouse was oriented towards the object with its nose within 2 cm of the object. One hour later a second trial took place, in which one object was replaced by a different one and exploration was scored for 5 min. In order to eliminate olfactory stimuli, chamber and objects were cleaned after testing each animal. To avoid preference for one of the objects, the order of the objects was balanced between testing animals. Results were expressed as percentage of time spent with the novel object with respect to the total exploration time (discrimination index).

Fear conditioning test

The conditioning procedure was carried out in a StartFear system (Panlab S.L., Spain) that allows recording and analysis of the signal generated by the animal movement through a high sensitivity weight transducer system. The analogical signal is transmitted to the FREEZING and STARTLE software modules through the load cell unit for recording purposes and posterior analysis in terms of activity/immobility. The conditioning box is housed inside a soundproof chamber, which minimized external stimulation during the conditioning and retention tests. The box was provided with a house light that supplied dim illumination and with a floor grid through which foot shocks could be administered.

On habituation day, the mice were placed in the conditioning chamber for 5 min. On training day, the mice were placed in the conditioning chamber for 2 min before the onset of a tone at 2800 Hz, 85 dB [conditioned stimulus (CS)], which lasted for 30 s. The final 2 s of the CS was paired with a 0.2 mA foot shock [unconditioned stimulus (US)]. Finally, 10 s after the CS-US, mice were returned to their home cages. Memory was evaluated 24 h after training. Mice were returned to the conditioning chamber and allowed to explore the context for 3 min, during which freezing behaviour was recorded (contextual fear conditioning). Freezing was defined as lack of movement except that required for breathing for at least 2 s and was analysed to give the percentage time freezing during exposure to the chamber. Under these experimental conditions the fear conditioning test is a contextual learning task dependent on the hippocampus (Leach et al., 2012; Ricobaraza et al., 2012). The conditioning apparatus was controlled by

the experimenter with specific software (Packwin; Panlab SL) running on a personal computer.

Neuronal primary culture

Hippocampal tissues from C57BL/6J mice embryos aged 19 d were homogenized in serum-free Neuro-Basal medium with 2% B27 supplement (Invitrogen, USA). Cells from each embryo were seeded separately in dishes that were pre-coated with poly-D-lysine MW 300000 (0.17 mg/ml; Sigma-Aldrich, USA) in PBS. Cells were grown for 10 d and the culture medium was changed every fourth day. On day 10, 1 μ M propranolol was added to a fresh and pre-warm medium and cells were collected 24 h after the treatment.

Cell viability was examined by means of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, which depends on the reduction of the tetrazolium salt MTT to formazan by living cells. Hippocampal/cortical mixed cells were cultured in 48-well plates and treated overnight with 8 μ M $A\beta_{25-35}$ fragments (Sigma-Aldrich, USA) and followed by an overnight incubation with propranolol (1 μ M). After treatment, MTT was dissolved in PBS (5 mg/ml) and added (10 μ l per 100 μ l medium) to all wells of the assay and incubated for 2 h at 37 °C. The MTT solution was aspirated and DMSO was added to the cells. Aliquots were transferred to a 96-well plate and absorbances were measured at 595 nm in a plate reader. Results were expressed as percentages of the respective value obtained for cells treated with 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.25.

Tissue collection

At the end of the behavioural studies, fasting mice were killed between 08:00 and 10:00 hours. Brains were removed and dissected on ice to obtain the hippocampus, or frozen immediately and stored at -80 °C, according to random assignment.

Western blotting

Cytosolic extract preparations from the hippocampus of mice were homogenized in a cold lysis buffer with protease inhibitors (0.2 M NaCl, 0.1 M Hepes, 10% glycerol, 200 mM NaF, 2 mM Na₄P₂O₇, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM benzamidine, 10 μ g/ml leupeptin, 400 U/ml aprotinin). Samples (20 μ g) were separated by electrophoresis on a sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel. Membranes were probed overnight at 4 °C with the corresponding primary antibodies (Table 1). Immunopositive bands were visualized using an enhanced

Table 1. Conditions used in Western blotting experiments

Protein	SDS–polyacrylamide gel	Molecular weight	Primary antibody (dilution)
IDE	13%	100 kDa	Anti-IDE (1:1000) ^a
pAkt	13%	60 kDa	Anti-pAkt (1:1000) ^b
Total Akt	13%	60 kDa	Anti-Akt (1:1000) ^b
Synaptophysin	13%	38 kDa	Anti-Synaptophysin (1:500) ^a
BACE1	13%	70 kDa	Anti-BACE 1 (1:1000) ^a
pJNK	13%	46 kDa	Anti-pSAPK/JNK Thr ¹⁸³ /Tyr ¹⁸⁵ (1:1000) ^b
Total JNK	13%	46 kDa	Anti-SAPK/JNK (1:1000) ^b
p τ (AT8)	13%	50 kDa	Anti-p τ Ser ²⁰² /Thr ²⁰⁵ AT8 (1:500) ^c
p τ (PHF1)	13%	62 kDa	Anti-PHF1- τ (1:500) ^a
Total τ	13%	50 kDa	Anti- τ T46 (1:1000) ^d
pGSK3 β	13%	46 kDa	Anti-pGSK3 β Ser ⁹ (1:1000) ^b
Total GSK3 β	13%	46 kDa	Anti-GSK3 β (1:1000) ^b
BDNF	10%	28 kDa	Anti-mBDNF (1:1000) ^a
proBDNF	10%	14 kDa	Anti-proBDNF ^a
APP C-terminal	7.5%	100 kDa	Anti-APP C-terminal (676–695; 1:2000) ^d
ADAM17	7.5%	37 kDa	Anti-ADAM17 (1:1000) ^a

SDS, Sodium dodecyl sulphate; IDE, insulin degrading enzyme; p, phosphorylated; SAPK, stress activated protein kinase; m, mature; JNK, c-Jun *N*-terminal kinase; GSK, glycogen synthase kinase; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; APP, amyloid precursor protein.

^a Abcam, USA.

^b Cell Signalling Technology, USA.

^c Pierce, USA.

^d Sigma-Aldrich, USA.

chemiluminescence Western blotting-detection reagent (ECL; UK). The optical density (OD) of reactive bands visible on X-ray film was determined densitometrically. β -Actin or α -tubulin was used as internal control. Results were expressed as percentage of OD values of control (non-transgenic saline) mice.

A β levels

For analysis of soluble A β ₄₀ and A β ₄₂ burden, the hippocampus was homogenized in a buffer containing 5 M guanidine HCl and 50 mM Tris–HCl, pH 8, protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Spain) and phosphatase inhibitors (0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF). A β levels were measured using a sensitive sandwich ELISA kit (Biosource, USA) following the manufacturer's instructions.

Data analysis and statistics

Data were analysed by SPSS for Windows, release 15.0. Normality was checked by Shapiro–Wilks's test ($p > 0.05$). Behavioural and biochemical data were analysed by Student's *t* test or two-way analysis of variance (ANOVA; genotype \times treatment). *Post hoc* comparisons were conducted, if appropriate, using Tukey's protected least significance test. Data are presented as

mean \pm S.E.M. The level of significance for all analyses testing was set at $p < 0.05$.

Results

Propranolol restored cognitive function in Tg2576 mice

Two-way ANOVA indicated a significant genotype \times treatment interaction on the measure of discrimination between new and familiar objects ($F_{1,31} = 9.191$, $p < 0.01$). Further analysis revealed that Tg2576 animals showed a significant learning impairment (Tukey's test, $p < 0.05$) that was reversed by propranolol treatment (Tukey's test, $p < 0.05$) (Fig. 1a).

The effects observed in NORT do not seem to be associated to differences in locomotor activity, as there was no difference in the total amount of time spent exploring two identical objects between non-transgenic and Tg2576 groups in the NORT (two-way ANOVA, $F_{1,31} = 0.013$, $p > 0.05$; Supplementary Fig. S1). Further supporting this fact, total distance travelled in the open field ($F_{1,31} = 0.906$, $p > 0.05$; Supplementary Fig. S1) was not affected by either genotype or treatment.

Mice were next given the fear conditioning test (contextual learning), another hippocampus-dependent

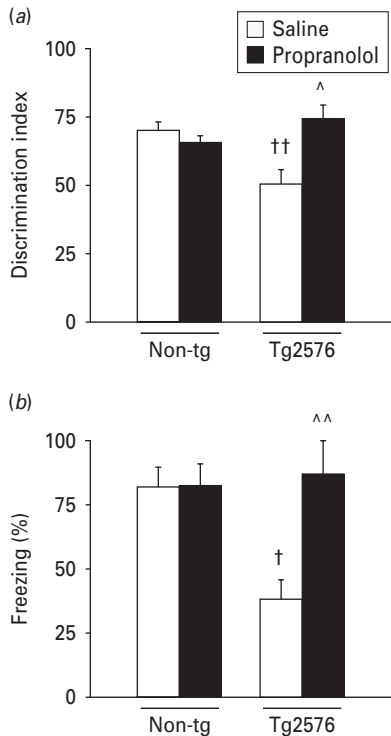


Fig. 1. Chronic treatment with propranolol reverses the learning deficit in Tg2576 transgenic mice. (a) Novel object recognition test, data shown as discrimination index (time exploring new object/total time of exploration \times 100); (b) Fear conditioning, data shown as percentage of freezing over the 2 min test. Two-way analysis of variance (ANOVA; genotype \times treatment) significant interaction: $\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.01$ significant differences vs. non-transgenic (Non-tg) saline-treated; $\wedge p < 0.05$, $\wedge\wedge p < 0.01$ significant differences vs. Tg2576 saline mice.

learning task, where Tg2576 mice are impaired. As shown in Fig. 1b, Tg2576 mice that received the propranolol showed a freezing response similar to that of the age-matched non-transgenic mice and much more than saline-treated Tg2576 animals (two-way ANOVA, significant interaction $F_{1,31} = 6.519$, $p < 0.05$).

All these data confirm that propranolol given chronically ameliorated the memory deficits of this AD mouse model.

Propranolol decreases A β burden and protects against A β toxicity

Tg2576 mice treated with propranolol exhibited significantly lower hippocampal levels of A β_{40} and A β_{42} (Student's *t*-test, $p < 0.05$, Fig. 2a). No A β was detected in non-transgenic littermates. The lowering effects of propranolol on A β burden could be related to both

a decrease in the production or to an increase in the clearance of A β . No differences were found in Tg2576 mice treated with either saline or propranolol in expression of APP or the β -secretase, BACE (Student's *t* test, Fig. 2b, c), suggesting that production of A β is not affected by propranolol. However, expression of the α -secretase, ADAM17 was increased in propranolol-treated mice (two-way ANOVA, main effect of treatment $F_{1,31} = 3.769$, $p < 0.05$; Fig. 2d).

To check clearance, the expression of insulin degrading enzyme (IDE), a metalloprotease that has a crucial part in A β clearance in the brain, was measured (Fig. 3a). It was found that propranolol was able to increase IDE expression, independently of genotype (two-way ANOVA, main effect of treatment, $F_{1,31} = 19.874$, $p < 0.001$).

To confirm that propranolol was able to directly increase IDE expression, cell culture neurons were exposed to propranolol ($1 \mu\text{M}$, 24 h) and it was found that IDE expression was significantly enhanced (Student's *t* test, $p < 0.01$, Fig. 3b). Under these conditions, these increases in IDE expression seem to lead to decreased A β effects (Fig. 3c). In the MTT assay, primary neurons treated with A β_{25-35} , $8 \mu\text{M}$, showed significantly reduced cell viability as compared with cells treated with sodium phosphate buffer (controls). In the presence of propranolol ($1 \mu\text{M}$), A β -induced cytotoxicity was significantly reversed (two-way ANOVA, $F_{1,19} = 19.536$, $p < 0.01$, followed by Tukey's test).

Effects of propranolol on markers of synaptic plasticity

The hippocampus is essential for the formation and storage of memories, which is in turn mediated, at least in part, by hippocampal synaptic plasticity. Reversal of memory dysfunction by propranolol in Tg2576 mice might be attributable to changes in synaptic plasticity. Several different markers of synaptic plasticity were selected to be analysed: Akt, as part of one of the most critical pathways in regulating cell survival; synaptophysin, as a widely used marker to estimate synaptic density; brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which helps the survival of existing neurons and facilitates the growth of new neurons and synapses.

There was a main effect of genotype and treatment regarding phosphorylated (p) Akt levels normalized to total Akt (main effect of genotype, $F_{1,31} = 58.399$, $p < 0.01$; and main effect of treatment $F_{1,31} = 20.031$, $p < 0.01$; Fig. 4a). Synaptophysin levels were also increased by propranolol (main effect of treatment, $F_{1,31} = 5.445$, $p < 0.05$, Fig. 4b).

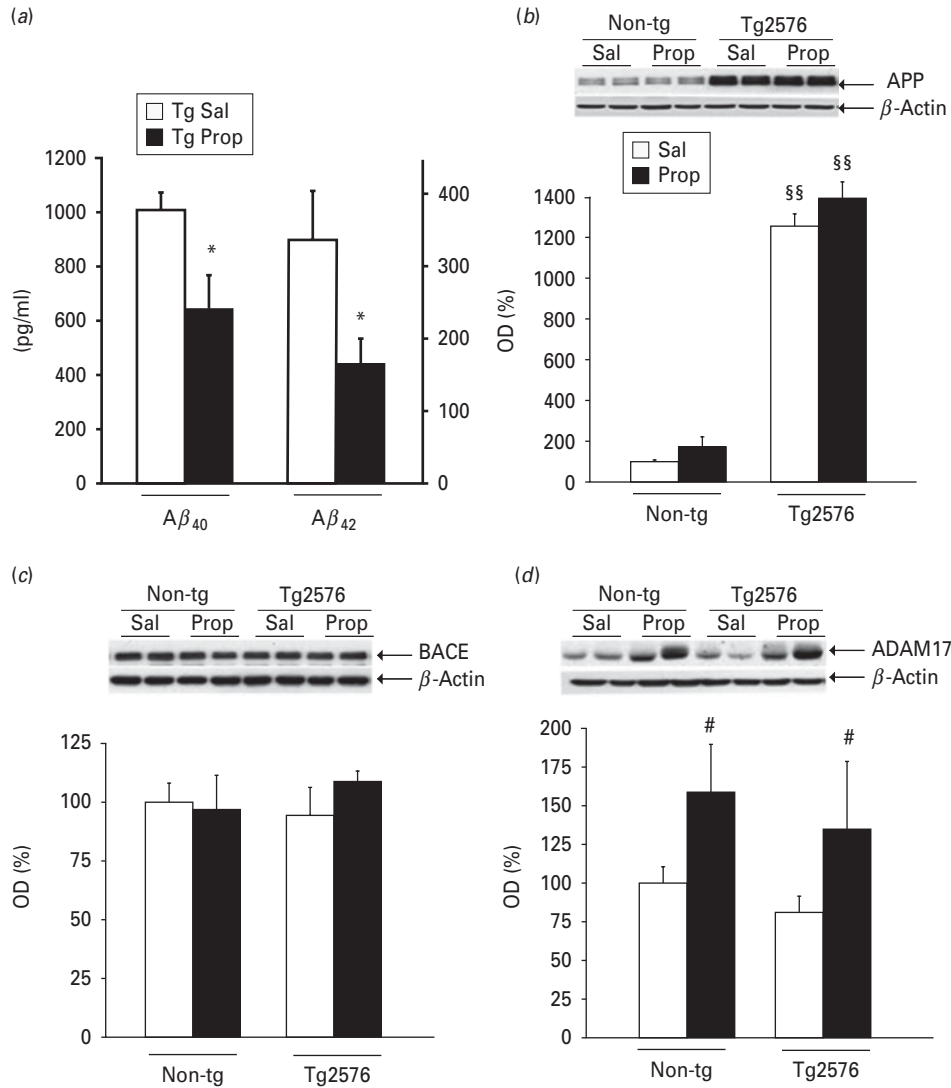


Fig. 2. Propranolol (Prop) decreases β -amyloid ($A\beta$) burden. $A\beta$ levels (a) and amyloid precursor protein (APP; b), BACE1 (c) and ADAM17 (d) expression in the hippocampus of Tg2576 transgenic mice. In (b), (c) and (d), representative Western blot bands from hippocampal tissues are shown. The histograms represent the quantification of the immunochemically reactive bands in the Western blot. Data are expressed as mean percentage of the results from the non-transgenic (Non-tg) mice receiving saline (Sal; Non-tg Sal, 100%). In (a) * significant effect, Student's *t* test. In (b) two-way analysis of variance (ANOVA; genotype \times treatment), ^{§§} $p < 0.01$ main effect of genotype. In (d) two-way ANOVA (genotype \times treatment), [#] $p < 0.05$ main effect of treatment.

BDNF is secreted to the extracellular matrix in a proBDNF form, which negatively affects survival and synaptic plasticity. However, proBDNF is mainly cleaved to mature (m) BDNF, which eventually has positive effects on survival, growth, synaptic plasticity and memory formation. Therefore, the proBDNF:mBDNF ratio has been measured (Fig. 4c) and a decrease in the pro-BDNF:mBDNF ratio has been found in Tg2576 mice (main effect of genotype, $F_{1,31}=9.930$, $p < 0.01$) while propranolol treatment was

able to increase these levels (main effect of treatment $F_{1,31}=5.855$, $p < 0.05$).

Effects of propranolol on τ pathology

Although Tg2576 mice do not suffer from real τ pathology in terms of neurofibrillar tangles, these animals manifest age-related hyperphosphorylated τ -containing neurites and higher activities of various τ kinases. Lately, it has been suggested that abnormal

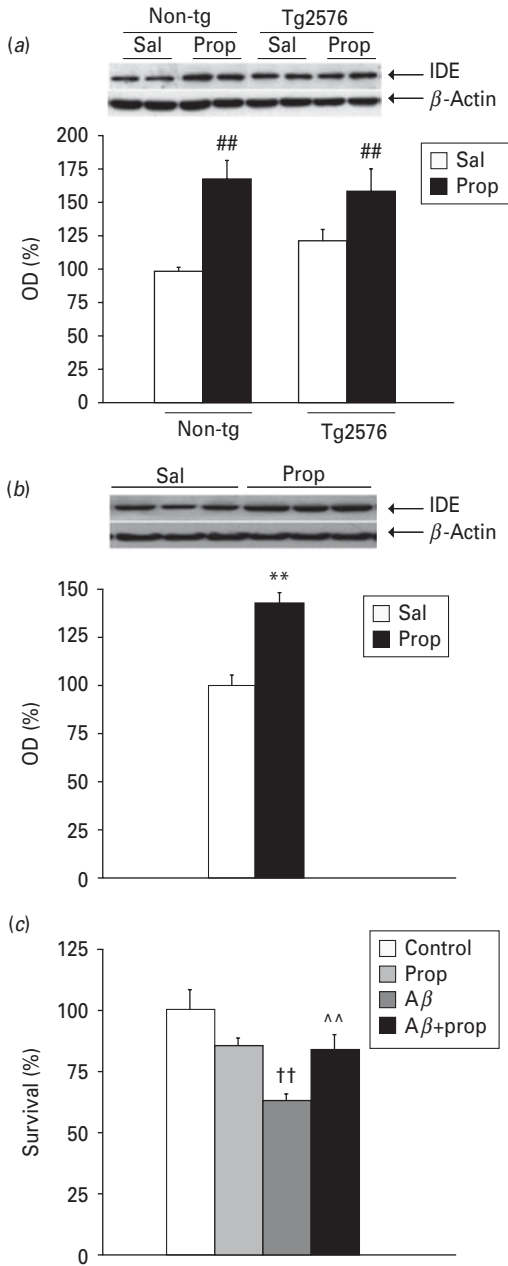


Fig. 3. Propranolol (Prop) increases β -amyloid ($A\beta$) clearance and toxicity. In (a) increased levels of insulin degrading enzyme (IDE) expression in the hippocampus of propranolol treated mice might reflect an increased clearance of $A\beta$ in the hippocampus of Tg2576 transgenic mice. In neuronal primary cultures IDE expression was also increased after propranolol treatment (b) and this treatment protected against $A\beta_{25-35}$ toxicity (c). In all cases representative Western blot bands from hippocampal tissues are shown. The histograms represent the quantification of the immunochemically reactive bands in the Western blot. Data are expressed as mean percentage of the results from the non-transgenic (Non-tg) mice receiving saline

τ phosphorylation is a secondary event to $A\beta$ pathology in AD. In addition, considering the significance of the Akt-glycogen synthase kinase (GSK)3 β - τ pathway and given the results found measuring Akt, we analysed next the levels of τ phosphorylation in the mice hippocampi. Immunoblot analysis showed a significant genotype \times treatment interaction regarding $p\tau$ at pSer²⁰²/Thr²⁰⁵, ($p\tau$ normalized to total τ levels; two-way ANOVA, $F_{1,31}=6.869$, $p<0.05$). Further analysis revealed that Tg2576 animals showed significant hyperphosphorylation of $p\tau$ that was reversed by propranolol treatment (Tukey's test, $p<0.05$, Fig. 5a). Similarly, $p\tau$ at Ser^{396/404}, using the PHF1 antibody (Fig. 5b), was also altered in Tg2576 mice (two-way ANOVA, significant genotype \times treatment interaction, $F_{1,31}=4.651$, $p<0.05$) and the increases in $p\tau$ levels showed by Tg2576 were reverted by propranolol (Tukey's test, $p<0.05$).

The expression of several kinases implicated in τ pathology was checked. As shown in Fig. 5c, there was also a significant interaction in pGSK3 β expression (pGSK3 β in Ser⁹, inactive form) normalized to total GSK3 β (two-way ANOVA, $F_{1,31}=4.349$, $p<0.05$). Further analysis revealed that Tg2576 animals showed decreased levels of pGSK3 β (Tukey's test, $p<0.05$) that was reversed by propranolol treatment (Tukey's test, $p<0.05$). Moreover, there was a genotype \times treatment interaction (two-way ANOVA, $F_{1,31}=6.828$, $p<0.05$) with regard to p-c-Jun N-terminal kinase (JNK)1 levels normalized to total JNK1. Western blot analysis revealed that pJNK1 levels were significantly increased in saline Tg2576 mice compared with non-transgenic mice (Tukey's test, $p<0.05$) and propranolol treatment was able to reverse these effects on pJNK1 expression (Tukey's test, $p<0.05$; Fig. 5d).

Consistent with a post-transcriptional regulation of these enzymes, total τ , JNK1 and GSK3 β levels, normalized using actin, remained unaltered.

Discussion

The main finding in this study is the reversal of memory deficits in the Tg2576 mouse model of AD using propranolol, a brain penetrating non selective

(Sal; Non-tg Sal, 100%). In (a), two-way analysis of variance (ANOVA; genotype \times treatment), ^{##} $p<0.01$ main effect of treatment. In cell culture experiments, (b) Student's *t* test, ^{**} $p<0.01$, significant differences vs. control. In (c) two-way ANOVA (A β \times Prop), significant interaction, ^{††} $p<0.01$, significant differences vs. control; ^{^^} $p<0.01$, significant differences vs. A β_{25-35} toxicity.

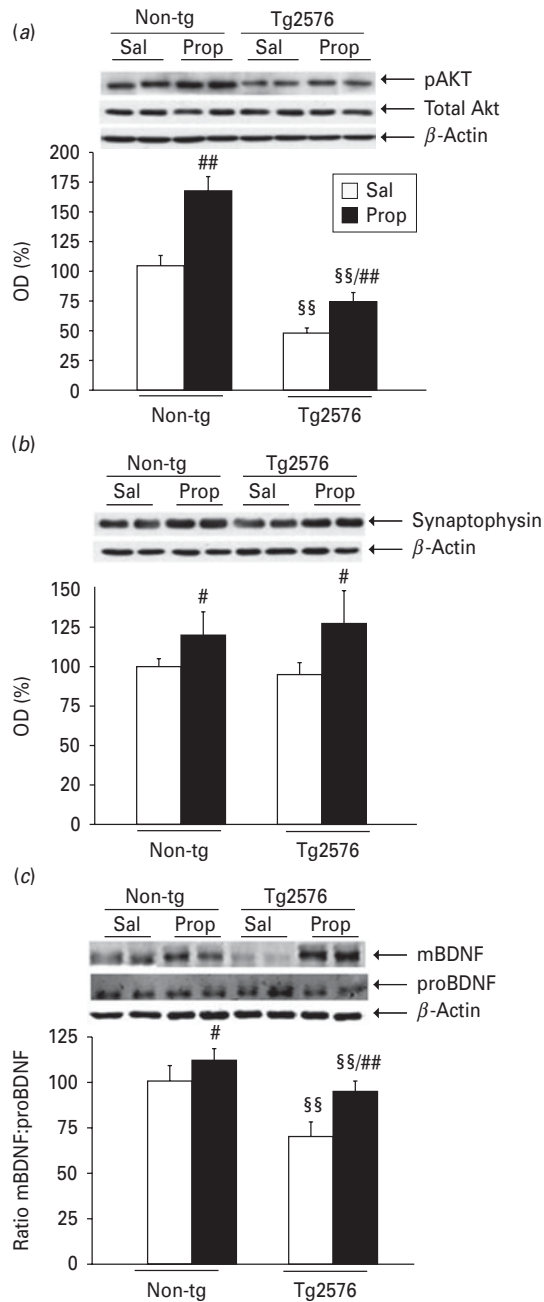


Fig. 4. Effects of propranolol (Prop) on markers of synaptic plasticity in the hippocampus. (a) Phosphorylated (p)Akt levels, (b) synaptophysin levels, (c) proBDNF mature (m)BDNF:proBDNF ratio. Representative Western blot bands from hippocampal tissues are shown. The histograms represent the quantification of the immunochemically reactive bands in the Western blot. Data are expressed as mean percentage of the results from the non-transgenic (Non-tg) mice receiving saline (Sal; Non-tg Sal, 100%). Two-way analysis of variance (ANOVA; genotype \times treatment): §§ $p < 0.01$, main effect of genotype; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, main effect of treatment.

β -adrenergic antagonist widely used as an antihypertensive drug. Previous work has reported the ability of propranolol to reverse cognitive deficits associated with deleterious insults such as chronic stress (Aisa et al., 2007). However, to our knowledge, this is one of the first reports describing pro-cognitive actions of propranolol in an experimental model of AD.

Because the overall goal of our study was to test the hypothesis that propranolol may influence AD-type $A\beta$ pathogenesis independent of blood pressure-lowering activity, we treated Tg2576 mice with 5 mg/kg propranolol. Based on the fact that the recommended dose of propranolol for the treatment of hypertension in humans is 160–320 mg/d and using US Food and Drug Administration criteria [human equivalent dose in mg/kg = animal dose in mg/kg \times (animal weight in kg/human weight in kg)^{0.33}; <http://www.fda.gov/cber/gdlns/dose.htm>] and the formula described by Reagan-Shaw et al. (2007) for converting drug equivalent dosages across species area [human equivalent dose in mg/kg animal dose in mg/kg \times Km mice (=3)/Km human (=37)], it can be calculated that the dose used in the present study is below the recommended human equivalent dosage range. Therefore, propranolol was used in the present study at a lower dose than that commonly prescribed for the treatment of hypertension in humans (Reagan-Shaw et al., 2007) and the results presented here seem to be independent from the antihypertensive effect of propranolol. In an attempt to elucidate the mechanisms underlying the beneficial effects of propranolol and based on previously published work (Wang et al., 2007), we focused our study on $A\beta$ and τ pathology, the two main pathological hallmarks in AD and in markers of synaptic plasticity.

A key issue was to determine the optimal age of Tg2576 mice for this study. Tg2576 mice show rapid increases in $A\beta$ levels starting at age 6 months and $A\beta$ peptide content in the brain accumulates exponentially between ages 7 and 12 months. Following our hypothesis that propranolol was able to alter $A\beta$ burden, Tg2576 mice aged 8 months (at the beginning of treatment) were chosen in order to be able to detect significant increases in $A\beta$ content in saline treated mice. Tg2576 mice aged 9 months (at the end of treatment) shown impairments in recognition memory (Mouri et al., 2007; Tagliabata et al., 2009) but spatial working memory is not altered until age 12–15 months (Hsiao et al., 1996; Reed et al., 2010). Therefore, the tests chosen to study the effects of propranolol on cognition have been the NORT, to assess recognition memory, and fear conditioning, to check contextual hippocampal dependent memory. Interestingly, in

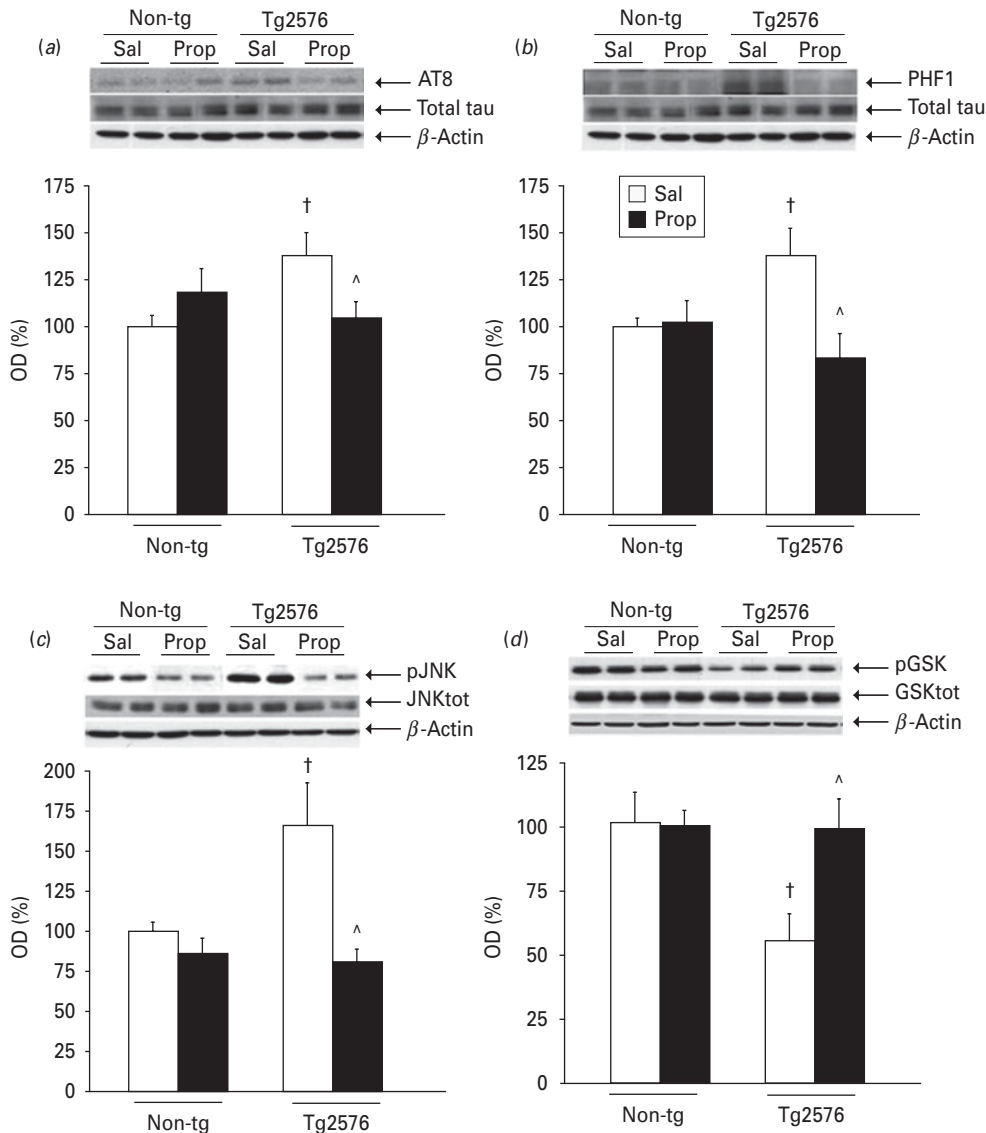


Fig. 5. Effects of propranolol treatment on τ pathology in the hippocampus. Propranolol regulates tau phosphorylation [p; (a) and (b)] through glycogen synthase kinase (GSK)3 β (c) and c-Jun N-terminal kinase (JNK)1 (d) in Tg2576 transgenic mice. Representative Western blot bands from hippocampal tissues are shown. The histograms represent the quantification of the immunoreactive bands in the Western blot. Data are expressed as mean percentage of the results from the non-transgenic (Non-tg) mice receiving saline (Sal; Non-tg Sal, 100%). Two-way analysis of variance (ANOVA; genotype \times treatment): significant interaction, $\dagger p < 0.05$, significant differences vs. non-transgenic Sal-treated, $\wedge p < 0.05$, significant differences vs. Tg2576 Sal mice. AT8 and PHF1, phosphorylated tau; tot, total.

our study, a chronic treatment with propranolol has been able to completely reverse memory deficits in both types of cognitive test. The effects of propranolol on memory are complex and, therefore, a note of caution should be exercised regarding the present effects on cognition. Infusion of a β -adrenergic receptor agonist improves memory consolidation (Cahill and McGaugh, 1996) and systemic propranolol impaired memory retrieval on a water maze spatial task (Murchison

et al., 2004). Alternatively, propranolol has been shown to reverse cognitive deficits associated with chronic stress (Aisa et al., 2007). In human volunteers, propranolol enhancement of cognitive flexibility is affected by how much difficulty the subject is encountering when searching for the solution (Campbell et al., 2008). In this respect, it has been suggested that the retention-enhancing effects of increased noradrenergic tone may be caused by influences on mechanisms other than

memory retrieval e.g. nonspecific effects on arousal and attention (Aston-Jones et al., 2000).

Given the genotypic nature of Tg2576 mouse, A β should be a major player in the memory dysfunction developed by this transgenic mouse. According to the amyloid cascade hypothesis (Hardy and Selkoe, 2002), A β is the starting point for a sequence of pathogenic events, such as τ hyperphosphorylation and neuroinflammation, that contribute to synaptic dysfunction and ultimately cause dementia. Therefore, although lately controversial in literature reports, it could be suggested that the reduction of A β burden by propranolol would consequently contribute to ameliorate AD symptoms. Accumulation of A β is proposed to result from an imbalance between A β production and A β clearance. Although changes in the amyloidogenic processing of APP cannot be completely excluded from the present work, the lack of effect of propranolol treatment on BACE1 expression seems to indicate that A β production is not altered by propranolol. However, the effects of propranolol on ADAM17 suggest that the non-amyloidogenic processing of APP could be facilitated in propranolol-treated mice. Alternatively, the brain possesses robust intrinsic A β clearance mechanisms (Tanzi et al., 2004). A β peptides are proteolytically degraded within the brain mainly by neprilysin (Iwata et al., 2000) and IDE (Kurochkin and Goto, 1994). It is unclear whether increased neprilysin levels may be beneficial to A β pathology, as this enzyme neither degrades A β oligomers nor restores memory function in an AD mouse model (Meilandt et al., 2009). Therefore, we have focused on IDE expression. The results found both in the Tg2576 mice and in cell culture experiments suggest that propranolol, by increasing IDE expression, is able to prevent the cellular damage induced by A β .

Although the Tg2576 mouse is a model of AD amyloidosis and Tg2576 mice do not suffer from real τ pathology in terms of neurofibrillar tangles, the presence of hyperphosphorylated τ epitopes (Ser¹⁹⁹, Thr²³¹/Ser²³⁵, Ser³⁹⁶ and Ser⁴¹³) and higher activities of various τ kinases has been consistently reported (Tomidokoro et al., 2001; Sasaki et al., 2002; Ferrer et al., 2005; Cuadrado-Tejedor et al., 2011 and shown in Fig. 4). In fact, A β amyloidosis can activate the τ kinase pathway involving GSK3 β (via its phosphorylation at Tyr²¹⁶) and, subsequently, τ is phosphorylated at sites that promote its accumulation and deposition (Tomidokoro et al., 2001; Otth et al., 2002). Among kinases implicated in τ pathology, data on activation of JNK1 seems to be of particular interest. JNK1 is a member of the mitogen-activated protein kinase family that plays a key role in neuronal plasticity,

regeneration and cell death (Kögel et al., 2005; Maruyama et al., 2009). Activation of JNK1 phosphorylates τ at sites recognized by the presently used PHF1 antibody (Bellucci et al., 2007). It is of note that JNK1 phosphorylates the insulin receptor substrate-1 at an inhibitory site that can block signal transduction by the insulin receptor (Sabio et al., 2008), therefore purportedly altering insulin-related intracellular pathways, namely the Akt-GSK3 β - τ . This Akt-GSK3 β route is required for the induction of long-term potentiation and depression, basic processes underlying learning and memory (van der Heide et al., 2006). Accordingly, it has been found, compared to controls, that treatment with propranolol in Tg2576 mice leads to decreased JNK1 activity accompanied by increased pAkt, increased pGSK-3 β (inactive form) and decreased *pr* expression. Together these data suggest that the decrease in the kinase activity of GSK3 β and JNK1 due to propranolol was able to prevent the signs of tauopathy observed in the hippocampus of Tg2576 mice, possibly contributing to the reinstatement of cognitive function as data, based on several lines of evidence from transgenic mice and humans, indicating a strong correlation between the extent of τ pathology and cognitive dysfunction (Guillozet et al., 2003; Hanger et al., 2009; Ashe and Zahs, 2010). Interestingly, propranolol seems to restore the GSK3 β or JNK1 pathways when they are hyperactivated but not under normal conditions. In fact, these pathways were not affected by propranolol when non-transgenic mice were analysed.

The reversion by propranolol of changes in markers of synaptic pathology in Tg2576 mice should be also considered. BDNF has been described to be highly protective for different neuronal phenotypes and can prevent neuronal cell death in different experimental paradigms *in vivo* as well as *in vitro* (Barde, 1994; Siegel and Chauhan, 2000). BDNF levels decline with age and are lower in AD brains than in those without dementia. BDNF delivery ameliorated age-related cognitive impairment in aged primates and mice even when the treatment was initiated after disease onset (Nagahara et al., 2009). Not only that, but synaptophysin seem to be a pre-synaptic vesicle protein partially regulated by BDNF (Tartaglia et al., 2001; Valtorta et al., 2004) and therefore reduced synaptophysin expression may result from a reduced BDNF function. However, hippocampal BDNF is secreted to the extracellular matrix in a proBDNF form. ProBDNF is active via p75 neurotrophin receptors and negatively affects survival and synaptic plasticity. ProBDNF is mainly cleaved to mature BDNF to activate TrkB receptors, which eventually has positive effects on survival,

growth, synaptic plasticity and memory formation. Therefore, the proBDNF:mBDNF ratio could be a more accurate form to anticipate BDNF outcomes. It is of note that it could have been expected that β -receptor blockade would have led to decreased BDNF levels (Flores et al., 2010). Therefore, the present increase in the ratio suggests that propranolol could modulate the cleavage of proBDNF to give rise to the mature form. An alternative is to consider the effects of propranolol on ADAM17 expression. Besides APP, many other membrane-bound pro-ligands with trophic or survival properties, such as epidermal growth factor, neuregulin 1 β or transforming growth factor- α , could be the substrate of ADAM17 (Dang et al., 2011). Thus, the possibility is that increases of ADAM17 might be increasing levels of these neurotrophic factors. In this respect, it has been described that cultured neurons from Tg2576 mice showed a reduced viability after treatment with an inhibitor of ADAM17 (Gil-Bea et al., 2012). In addition, it is noted that propranolol was able to increase pAkt, synaptophysin and BDNF also in non-transgenic mice. Even though the mechanism responsible for increases by propranolol in these synaptic markers cannot be unravelled from the present results, it is possible to speculate about the usefulness of this compound for the treatment of any pathology associated with a decreased synaptic function.

Concluding remarks

Collectively, our evidence suggest that some of the drugs, namely propranolol, currently prescribed for the treatment of high blood pressure might also beneficially modulate AD by mechanisms independent of changes in blood pressure (Zhao et al., 2009). Propranolol may have AD-modifying activity and may protect against progressive A β / τ -related memory deficits. Although further studies would help to fully understand the mechanisms by which propranolol exert its effects on AD-related pathology, the present preclinical work should foster future clinical studies on the use of propranolol for the treatment of AD.

Acknowledgements

This work has been supported by a grant from FIS (10/01748) and 'Tu eliges, Tu decides' projects of CAN.

Conflicts of Interest

None.

Supplementary material

For supplementary material accompanying this paper, visit <http://dx.doi.org/10.1017/S1461145713000631>.

References

- Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ (2007) Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32:256–266.
- Ashe KH, Zahs KR (2010) Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* 66:631–645.
- Aston-Jones G, Rajkowski J, Cohen J (2000) Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention. *Prog Brain Res* 126:165–182.
- Barde YA (1994) Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Prog Clin Biol Res* 390:45–56.
- Bellew KM, Pigeon JG, Stang PE, Fleischman W, Gardner RM, Baker WW (2004) Hypertension and the rate of cognitive decline in patients with dementia of the Alzheimer type. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 18:208–213.
- Bellucci A, Rosi MC, Grossi C, Fiorentini A, Luccarini I, Casamenti F (2007) Abnormal processing of tau in the brain of aged TgCRND8 mice. *Neurobiol Dis* 27:328–338.
- Cahill L, McGaugh JL (1996) Modulation of memory storage. *Curr Opin Neurobiol* 6:237–242.
- Campbell HL, Tivarus ME, Hillier A, Beversdorf DQ (2008) Increased task difficulty results in greater impact of noradrenergic modulation of cognitive flexibility. *Pharmacol Biochem Behav* 88:222–229.
- Cuadrado-Tejedor M, Hervias I, Ricobaraza A, Puerta E, Pérez-Roldán JM, García-Barroso C, Franco R, Aguirre N, García-Osta A (2011) Sildenafil restores cognitive function without affecting A β burden in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol Aging* 164:2029–2041.
- Cummings JL, Cole G (2002) Alzheimer disease. *J Am Med Assoc* 287:2335–2338.
- Dang M, Dubbin K, D'Aiello A, Hartmann M, Lodish H, Herrlich A (2011) Epidermal growth factor (EGF) ligand release by substrate-specific α 5 β 1 integrin and metalloproteases (ADAMs) involves different protein kinase C (PKC) isoenzymes depending on the stimulus. *J Biol Chem* 286:17704–17713.
- Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one trial-test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47–59.
- Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B, Freixes M, Ribé E, Dalfó E, Avila J (2005) Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 2:3–18.
- Flores O, Núñez H, Pérez H, Morgan C, Soto-Moyano R, Valladares L, Burgos H, Olivares R, Hernández A (2010) beta-Adrenoceptor blockade depresses molecular and

- functional plasticities in the rat neocortex. *Brain Res Bull* 82:284–288.
- Gil-Bea FJ, Gerenu G, Aisa B, Kirazov LP, Schliebs R, Ramírez MJ (2012) Cholinergic denervation exacerbates amyloid pathology and induces hippocampal atrophy in Tg2576 mice. *Neurobiol Dis* 48:439–346.
- Guillozet AL, Weintraub S, Mash DC, Mesulam MM (2003) Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 60:729–736.
- Guo Z, Viitanen M, Winblad B, Fratiglioni L (1999) Low blood pressure and incidence of dementia in a very old sample: dependent on initial cognition. *J Am Geriatr Soc* 47:723–726.
- Hajjar I, Keown M, Frost B (2005) Antihypertensive agents for aging patients who are at risk for cognitive dysfunction. *Curr Hypertens Rep* 7:466–473.
- Hanger DP, Seereeram A, Noble W (2009) Mediators of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 9:1647–1666.
- Hardy J (2006) Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved? *Curr Alzheimer Res* 3:71–73.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–356.
- Hoffman LB, Schmeidler J, Lesser GT, Beeri MS, Purohit DP, Grossman HT, Haroutunian V (2009) Less Alzheimer disease neuropathology in medicated hypertensive than non hypertensive persons. *Neurology* 72:1720–1726.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99–102.
- in't Veld BA, Ruitenbergh A, Hofman A, Stricker BH, Breteler MM (2001) Antihypertensive drugs and incidence of dementia: the Rotterdam study. *Neurobiol Aging* 22:407–412.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y, Saido TC (2000) Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 6:143–150.
- Khachaturian AS, Zandi PP, Lyketsos CG, Hayden KM, Skoog I, Norton MC, Tschanz JT, Mayer LS, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC (2006) Antihypertensive medication use and incident Alzheimer disease: the Cache County Study. *Arch Neurol* 63:686–692.
- Kögel D, Schomburg R, Copanaki E, Prehn JH (2005) Regulation of gene expression by the amyloid precursor protein: inhibition of the JNK/cJun pathway. *Cell Death Differ* 12:1–9.
- Kurochkin IV, Goto S (1994) Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett* 345:33–37.
- Leach PT, Poplawski SG, Kenney JW, Hoffman B, Liebermann DA, Abel T, Gould TJ (2012) Gadd45b knockout mice exhibit selective deficits in hippocampus-dependent long-term memory. *Learn Mem* 19:319–324.
- Lithell H, Hansson L, Skoog I, Elmfeldt D, Hofman A, Olofsson B, Trenkwalder P, Zanchetti A, SCOPE Study Group (2004) The study on COgnition and prognosis in the elderly (SCOPE); outcomes in patients not receiving add-on therapy after randomization. *J Hypertens* 22:1605–1612.
- Luchsinger JA, Reitz C, Honig LS, Tang MX, Shea S, Mayeux R (2005) Aggregation of vascular risk factors and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology* 65:545–551.
- Maruyama J, Naguro I, Takeda K, Ichijo H (2009) Stress-activated MAP kinase cascades in cellular senescence. *Curr Med Chem* 16:1229–1235.
- Meilandt WJ, Cisse M, Ho K, Wu T, Esposito LA, Scarse-levie K, Cheng IH, Yu GQ, Mucke L (2009) Neprilysin overexpression inhibits plaque formation but fails to reduce pathogenic A β oligomers and associated cognitive deficits in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 29:1977–1986.
- Mouri A, Noda Y, Hara H, Mizoguchi H, Tabira T, Nabeshima T (2007) Oral vaccination with a viral vector containing Abeta cDNA attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model. *FASEB J* 163:2135–2148.
- Murchison CF, Zhang XY, Zhang WP, Ouyang M, Lee A, Thomas SA (2004) A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell* 117:131–143.
- Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH (2009) Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 15:331–337.
- Ott C, Concha II, Arendt T, Stielor J, Schliebs R, González-Billault C, Maccioni RB (2002) AbetaPP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576. *J Alzheimers Dis* 4:417–430.
- Peskind ER, Tsuang DW, Bonner LT, Pascualy M, Riekse RG, Snowden MB, Thomas R, Raskind MA (2005) Propranolol for disruptive behaviors in nursing home residents with probable or possible Alzheimer disease: a placebo-controlled study. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 19:23–28.
- Petrovitch H, White LR, Izmirlian G, Ross GW, Havlik RJ, Markesbery W (2000) Midlife blood pressure and neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and brain weight at death: the HAAS. Honolulu-Asia aging study. *Neurobiol Aging* 21:57–62.
- Prince M, Rabe-Hesketh S, Brennan P (1998) Do antiarthritic drugs decrease the risk for cognitive decline? An analysis based on data from the MRC treatment trial of hypertension in older adults. *Neurology* 50:374–379.

- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2007) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22:659–661.
- Reed MN, Liu P, Kotilinek LA, Ashe KH (2010) Effect size of reference memory deficits in the Morris water maze in Tg2576 mice. *Behav Brain Res* 212:115–120.
- Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, Marco S, Pérez-Otaño I, García-Osta A (2012) Phenylbutyrate rescues dendritic spine loss associated with memory deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus* 22:1040–1050.
- Roozendaal B, Hahn EL, Nathan SV, de Quervain DJ, McGaugh JL (2004) Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. *J Neurosci* 24:8161–8169.
- Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko HJ, Barrett T, Kim JK, Davis RJ (2008) A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322:1539–1543.
- Sasaki A, Shoji M, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Ikeda M, Naito M, Matsubara E, Abe K, Nakazato Y (2002) Amyloid cored plaques in Tg2576 transgenic mice are characterized by giant plaques, slightly activated microglia, and the lack of paired helical filament-typed, dystrophic neurites. *Virchows Arch* 441:358–367.
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789–791.
- Shankle WR, Nielson KA, Cotman CW (1995) Low-dose propranolol reduces aggression and agitation resembling that associated with orbitofrontal dysfunction in elderly demented patients. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 9:233–237.
- Siegel GJ, Chauhan NB (2000) Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Rev* 33:199–227.
- Skoog I, Gustafson D (2006) Update on hypertension and Alzheimer's disease. *Neurol Res* 28:605–611.
- Sparks DL, Scheff SW, Liu H, Landers T, Danner F, Coyne CN, Hunsaker JC III (1996) Increased density of senile plaques (SP), but not neurofibrillary tangles (NFT), in non-demented individuals with the apolipoprotein E4 allele: comparison to confirmed Alzheimer's disease patients. *J Neurol Sci* 138:97–104.
- Tagliatalata G, Hogan D, Zhang WR, Dineley KT (2009) Intermediate- and long-term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition. *Behav Brain Res* 200:95–99.
- Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL (2004) Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron* 43:605–608.
- Tartaglia N, Du J, Tyler WJ, Neale E, Pozzo-Miller L, Lu B (2001) Protein synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 276:37585–37593.
- Tomidokoro Y, Ishiguro K, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Park JM, Yasutake K, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M (2001) Abeta amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP(Sw) mice. *Neurosci Lett* 299:169–172.
- Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F (2004) Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* 26:445–453.
- van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP (2006) Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol* 79:205–221.
- Wang J, Ho L, Chen L, Zhao Z, Zhao W, Qian X, Humala N, Seror I, Bartholomew S, Rosendorff C, Pasinetti GM (2007) Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 117:3393–3402.
- Zhao W, Wang J, Ho L, Ono K, Teplow DB, Pasinetti GM (2009) Identification of antihypertensive drugs which inhibit amyloid-beta protein oligomerization. *J Alzheimers Dis* 16:49–57.

Capítulo V

Chapter 5

Propranolol reduces cognitive deficits, amyloid β levels, Tau phosphorylation and insulin resistance in response to chronic corticosterone administration

Resumen

La exposición crónica a glucocorticoides puede llevar no solo a una situación de resistencia a la insulina o a déficits cognitivos, si no que además se considera un factor de riesgo para patologías como la Enfermedad de Alzheimer (EA). El propranolol es un antagonista β -adrenérgico comúnmente utilizado en el tratamiento de la hipertensión y de la ansiedad aguda. Se han evaluado en este trabajo los efectos de la administración del β -bloqueante propranolol (5 mg/kg) en un modelo de administración crónica de corticosterona (100 μ g/ml, 4 semanas) en agua de bebida. La administración de corticosterona produce alteraciones cognitivas en el test de reconocimiento del nuevo objeto que fueron revertidas por el propranolol. El aumento de los niveles de A β en el hipocampo de los ratones tratados con corticosterona fue contrarrestado por el tratamiento con propranolol, posiblemente mediante un aumento de la expresión de IDE. El tratamiento crónico con corticosterona induce respuestas características de resistencia a la insulina, como aumentos periféricos de los niveles de insulina, descensos de la activación de los receptores de insulina (pIR) y disminución de las vías intracelulares asociadas (pAkt). Estos efectos parecen estar relacionados con descensos de la expresión de c-Jun N quinasa terminal (JNK1). El propranolol fue capaz de contrarrestar todos estos efectos inducidos por la corticosterona. Una de las principales quinasas responsables de la fosforilación de Tau, la glucógeno sintasa 3 β (GSK3 β), que es inactivada mediante la fosforilación de pAkt, se encontró que estaba disminuída tras el tratamiento con corticosterona y aumentada tras el tratamiento con propranolol. Además, se encontraron aumentos en la expresión de Tau fosforilada. En general, estos resultados refuerzan la idea de que el propranolol podría considerarse un potencial agente terapéutico para las patologías asociadas a la interacción glucocorticoides/insulino-resistencia y el desarrollo de procesos celulares relevantes para la EA.

Abstract

Chronic exposure to glucocorticoids might result not only in insulin resistance or cognitive deficits, but it is also considered as a risk factor for pathologies such as Alzheimer's disease. Propranolol is a β -adrenergic antagonist commonly used in the treatment of hypertension or acute anxiety. It has been tested here the effects of the β -blocker propranolol (5 mg/kg) in a model of chronic corticosterone administration (100 μ g/ml, 4 weeks) in drinking water. Corticosterone administration led to cognitive impairment in the novel object recognition test that was reversed by propranolol. Increased levels of A β in the hippocampus of corticosterone treated mice were counteracted by propranolol treatment, purportedly through an increased IDE expression. Chronic corticosterone treatment induced responses characteristic of insulin resistance, as increased peripheral insulin levels, decreased activation of the insulin receptor (pIR) and decreased associated intracellular pathways (pAkt). These effects might be related to a decreased c-Jun N terminal kinase 1 (JNK1) expression. Again, propranolol was able to counteract all corticosterone-induced effects. One of the main kinases involved in Tau phosphorylation, glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), which is inactivated by phosphorylation by pAkt, was found to be decreased after corticosterone and increased after propranolol treatment. Concomitant changes in pTau expression were found. Overall, these data further strengthen the potential of propranolol as a therapeutic agent for pathologies associated to the interaction glucocorticoids-insulin resistance and the development of relevant cellular processes for Alzheimer's disease.

Keywords:

A β , Tau, JNK1, IDE, BACE1, Akt, GSK-3 β , hippocampus



Propranolol reduces cognitive deficits, amyloid β levels, tau phosphorylation and insulin resistance in response to chronic corticosterone administration

Marta Dobarro¹, Lourdes Orejana¹, Norberto Aguirre¹ and Maria J. Ramírez^{1,2}

¹ Dpto Farmacología, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

² Division of Neurosciences, CIMA, Pamplona, Spain

Abstract

Chronic exposure to glucocorticoids might result not only in insulin resistance or cognitive deficits, but it is also considered as a risk factor for pathologies such as Alzheimer's disease. Propranolol is a β -adrenergic antagonist commonly used in the treatment of hypertension or acute anxiety. The effects of propranolol (5 mg/kg) have been tested in a model of chronic corticosterone administration (100 μ g/ml, 4 wk) in drinking water. Corticosterone administration led to cognitive impairment in the novel object recognition test that was reversed by propranolol. Increased levels of A β in the hippocampus of corticosterone-treated mice were counteracted by propranolol treatment, purportedly through an increased IDE expression. Chronic corticosterone treatment induced responses characteristic of insulin resistance, as increased peripheral insulin levels, decreased activation of the insulin receptor (pIR) and decreased associated intracellular pathways (pAkt). These effects might be related to a decreased c-Jun N terminal kinase 1 expression. Again, propranolol was able to counteract all corticosterone-induced effects. One of the main kinases involved in tau phosphorylation, glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), which is inactivated by phosphorylation by pAkt, was found to be decreased after corticosterone and increased after propranolol treatment. Concomitant changes in pTau expression were found. Overall, these data further strengthen the potential of propranolol as a therapeutic agent for pathologies associated with the interaction glucocorticoids-insulin resistance and the development of relevant cellular processes for Alzheimer's disease.

Received 16 July 2012; Reviewed 30 August 2012; Revised 28 September 2012; Accepted 17 October 2012;

First published online 30 November 2012

Key words: A β , Akt, JNK1, IDE, tau.

Introduction

Glucocorticoids are among the most widely prescribed drugs used for human diseases, such as autoimmune diseases or many acute or chronic inflammatory diseases. Glucocorticoids are also the main effectors of stress responses. Chronic elevation of glucocorticoid (cortisol in humans, corticosterone in rodents) levels could lead to serious deleterious effects. In particular, clinical data have shown hypersecretion glucocorticoids in Alzheimer's disease (AD; Elgh et al., 2006; Popp et al., 2009; Gil-Bea et al., 2010) and epidemiological studies have identified a stressful life-style as a risk factor for developing AD (Wilson et al., 2005; Ownby et al., 2006). Csernansky et al. (2006) also showed that initially higher serum glucocorticoids in the pre-dementia clinical stage of AD predict a more rapid cognitive decline. On the other

hand, epidemiological studies suggesting that anti-inflammatory therapy with glucocorticoids may be useful in the treatment of AD were refuted in a randomized controlled trial with prednisone (Aisen et al., 2000). Experimentally, elevation of circulating glucocorticoid concentrations by systemic administration of corticosterone or glucocorticoid receptor agonists exerts an inhibitory influence on learning and memory retrieval (Roosendaal et al., 2004b, c; Aisa et al., 2007; Coluccia et al., 2008; Abercrombie et al., 2011). It has been suggested that the effects of glucocorticoids on memory depend on noradrenergic activation of the amygdala and interactions of the amygdala with other brain regions, mainly hippocampus and frontal cortex (review by Roosendaal et al., 2006). In fact, administration of the β -blocker propranolol was able to reverse cognitive deficits associated with either chronic stress (Aisa et al., 2007) or intra-hippocampal administration of a glucocorticoid receptor agonist (Roosendaal et al., 2004a).

In addition to cognitive deficits, AD is characterized by the progressive accumulation in the brain of senile plaques composed of β -amyloid protein (A β) and the

Author for correspondence: Dr M. J. Ramírez, Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Navarra, Irunlarrea 1, 31008 Pamplona, Spain.

Tel.: +34 948 425600 Fax: +34 948 425649

Email: mariaja@unav.es

presence of neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated tau. Increased corticosterone levels provoke misprocessing of amyloid precursor peptide in the rat hippocampus, resulting in increased levels of A β (Ploj et al., 2003; Catania et al., 2009) and to potentiate the deleterious effects of A β on neuronal survival (Sotiropoulos et al., 2008a, b). Not only that, but in experimental models of AD, stress or glucocorticoids exacerbated AD-like neuropathology (Green et al., 2006; Jeong et al., 2006; Kang et al., 2007; Carroll et al., 2011). Interestingly, propranolol has been shown to decrease A β levels *in vitro* (Wang et al., 2007).

The present work aims to study whether propranolol could ameliorate memory impairments and amyloid pathology in a model of chronic glucocorticoid treatment. Propranolol is a β -adrenergic antagonist commonly used in the treatment of hypertension or acute anxiety. Epidemiological evidence supports the use of specific cardiovascular agents, especially β -blockers, to protect elderly hypertensive subjects from developing AD (Guo et al., 1999). It is proposed here that propranolol, at lower doses than those used as antihypertensive, could ameliorate not only memory impairments and amyloid pathology but also tau hyperphosphorylation in a situation of chronic corticosterone administration.

Method

Animals

Experiments were carried out in 32 male AKR/J mice (30–35 g, aged 6 months at the beginning of treatment). AKR/J mice are relatively resistant to aortic lesion formation on a semi-synthetic high-fat diet and are hyporesponsive to diets containing high levels of fat and cholesterol. In terms of behavioural studies, AKR/J mice are well known as these mice were selectively bred to establish a senescence prone (SAMP) strain, having inherited early onset and irreversible advancement of senescence and a resistant (SAMR) strain (Flood and Morley, 1998). The strain used for the present study is the SAMR1 strain, characterized by normal ageing (Takeda, 1999). This strain is frequently used as a control in studies using SAMP8 mice of accelerated senescence and in the field of AD (Morley et al., 2012). Animals were housed (five per cage) in constant conditions of humidity and temperature (22 ± 1 °C) with a 12 h/12 h light–dark cycle (lights on 07:00 hours). Food and water were available *ad libitum*. All the procedures followed in this work were in compliance with the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and were approved by the Ethical Committee of the University of Navarra. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals. Behavioural experiments were conducted between 09:00 and 13:00 hours. Animals were randomly assigned to the different experimental groups ($n = 8$ per group).

Drug treatment and experimental design

For 4 wk, mice received drinking water with a solution containing 100 μ g/ml corticosterone (Sigma-Aldrich, USA) in 1% ethanol. This approach was used as a non-invasive way of altering plasma corticosterone levels while retaining some integrity in the diurnal rhythm present in normal animals. It has been shown that this approach has advantages over methods involving constant corticosterone pellets or corticosterone injections (Karatsoreos et al., 2010). Propranolol (5 mg/kg; Dobarro et al., 2012) was dissolved in saline and administered (i.p.) once per day during the whole treatment with corticosterone. Based on the fact that the recommended dose of propranolol for the treatment of hypertension in humans is 160–320 mg/d and, using the formula described by Reagan-Shaw et al. (2007) for converting drug equivalent dosages across species [human equivalent dose in mg/kg = animal dose in mg/kg \times km mice (=3)/km human (=37)], it can be calculated that the dose used in the present study is below the recommended human equivalent dosage range. Therefore, there were four experimental groups: control saline; corticosterone; propranolol; corticosterone + propranolol. There were no differences in the initial weight or weight gain of animals among groups.

Behavioural tests

After the 4 wk of treatments, and over 3 consecutive days, behavioural experiments were conducted between 09:00 and 13:00 hours. During behavioural testing, corticosterone was kept in the drinking water. To avoid purported effects of an acute administration, propranolol administration took place 20 h before any behavioural test.

Locomotor activity

Horizontal locomotor activity was measured for 30 min in an open field, which consisted of four square arenas ($65 \times 65 \times 45$ cm³) made of black wood, using a video tracking system (Ethovision 3.0; Noldus Information Technology BV, The Netherlands), in a softly illuminated room. Total path length (cm) was analysed.

Cognitive testing: novel object recognition test (NORT)

The NORT was performed as previously described (Aisa et al., 2007) and it was adapted from Ennaceur and Delacour (1988). The open field consisted of a square open field ($65 \times 65 \times 45$ cm³) made of black wood. During the first trial of the experiment (sample trial), two objects (prisms, conical tubes weighted with coloured sand or small objects were constructed using Lego[®] blocks) similar in shape, size, colour, texture, etc., equidistant from the sides (10 cm) were placed within the chamber. The animal was placed into the centre of the open field and allowed to freely explore for 5 min. It was considered

Table 1. Conditions used in Western blotting experiments

Protein	molecular weight (kDa)	SDS	polyacrylamide gel (%)	primary antibody	weight (dilution)
IDE	100	13	13	Anti-IDE	(1:1000) ^a
pAkt	60	13	13	Anti-pAkt Ser473	(1:1000) ^b
Total Akt	60	13	13	Anti-Akt	(1:1000) ^b
BACE 1	70	13	13	Anti BACE 1	(1:1000) ^a
pJNK	46	13	13	Anti-pSAPK/JNK Thr183/Tyr185	(1:2000) ^b
Total JNK	46	13	13	Anti-SAPK/JNK	(1:2000) ^b
pTau (PHF1)	62	13	13	Anti-PHF1-Tau	(1:3000) ^a
Total tau	50	13	13	Anti-tau T46	(1:2000) ^c
pGSK3 β	46	13	13	Anti-pGSK3 β Ser9	(1:1000) ^b
Total GSK3 β	46	13	13	Anti-GSK3 β	(1:500) ^b
Neprilysin	86	13	13	Anti-Neprilysin	(1:1000) ^d
pIR (Y1361)	90	7.5	7.5	Anti-pIR (Y1361)	(1:500) ^a
Total IR	90	7.5	7.5	Anti-IR (Y1361)	(1:500) ^b

IDE, Insulin degrading enzyme; pJNK, phosphorylated c-Jun N terminal kinase;

pGSK3 β , phosphorylated glycogen synthase kinase 3 β ; IR, insulin receptor.

Source of antibodies: ^aAbcam, USA; ^bCell Signaling Technology, USA;

^c Sigma-Aldrich, USA; ^d Millipore Corporation, USA.

that the animal was exploring the object when the head of the mouse was oriented toward the object with its nose within 2 cm of the object. Mice were video recorded (Pinacole Studio 9.0; Pinnacle Systems, USA) and the total time spent exploring was measured. One or 24 h later, a second trial (test trials) took place, in which one object was replaced by a different one and exploration was scored for 5 min. In order to eliminate olfactory stimuli, the chamber and objects were cleaned after testing each animal. To avoid preference for one of the objects, the order of the objects was a balance between testing animals. Results were expressed as percentage of time spent with the novel object with regard to the total exploration time (discrimination index).

Tissue and blood collection

To avoid interfering effects of acute treatments, fasting mice were killed by decapitation between 08:00 and 10:00 hours, 20 h after cessation of corticosterone or propranolol treatment. Brains were removed and dissected on dry ice to obtain the hippocampus. Trunk blood was placed in EDTA tubes, centrifuged at 12 500 g (15 min, 4 °C) and plasma was frozen until insulin levels were determined.

Insulin measurements

Insulin was measured in 10 μ l plasma samples using the Sensitive Mouse Insulin Enzyme Immunoassay Kit (EZRMI-13K; Millipore, USA).

Western blotting

Cytosolic extract preparations from the hippocampus of mice were obtained by homogenization of hippocampal

tissue in a Tris buffer (pH 7.2, 4 °C) of the following composition: Tris 50 mM HCl (Trizma[®] hydrochloride; Sigma), 150 mM NaCl (Sigma), 1% Nonidet P-40 (Roche, Switzerland), 150 mM EGTA (Sigma), 1:100 inhibitor proteases and phosphatases cocktail (Complete[™] Protease Inhibitor Cocktail; Roche). After a 13000 rpm (10 000 g) centrifugation (20 min), the pellet was discarded and protein levels were measured by the Bradford method in the supernatant (cytosolic fraction). Samples were separated by electrophoresis on a sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel. Membranes were probed overnight at 4 °C with the corresponding primary antibodies (Table 1). Immunopositive bands were visualized using an enhanced chemiluminescence Western blotting detection reagent (ECL; Amersham, UK). The optical density (OD) of reactive bands visible on X-ray film was determined densitometrically. β -actin was used as internal controls. Results were expressed as percentage of OD values of control saline-treated mice.

A β levels

As previously described (Suzuki et al., 1994; Julien et al., 2010), A β ₄₂ levels were determined with BC05 antibody, specific for the C-terminal of A β ₄₂, using a commercially available high-sensitive ELISA kit (sensitivity 0.024 pmol/l) following manufacturer instructions (Wako Pure Chemical Industries, Japan).

Data analysis and statistics

Data were analysed by SPSS for Windows, release 15.0. Normality was checked by Shapiro–Wilks's test ($p > 0.05$). Behavioural and biochemical data were analysed by two-way analysis of variance (ANOVA; corticosterone \times propranolol), followed by Scheffe's test.

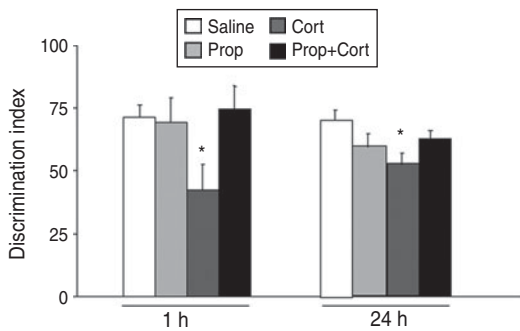


Fig. 1. Treatment with propranolol (Prop) reverses the cognitive deficit in corticosterone (Cort) mice in the novel object recognition test. Data shown as discrimination index (time exploring new object/total time of exploration \times 100). Two-way analysis of variance (Cort \times Prop), significant interaction, $*p < 0.05$ vs. control saline-treated.

Results

Effects of propranolol on corticosterone-treated mice: cognitive studies

As shown in Fig. 1, recognition memory was significantly impaired by a chronic treatment with corticosterone and this cognitive impairment was completely reversed by propranolol ($F_{1,31} = 4.287$, $p < 0.05$, Scheffe's test, $p < 0.05$). Similarly, in the 24 h paradigm, a more demanding test in terms of cognition, there was a significant corticosterone \times propranolol treatment interaction ($F_{1,31} = 4.175$, $p < 0.05$) and cognitive impairment induced by corticosterone administration was reversed by propranolol treatment (Scheffe's test, $p < 0.05$).

The effects observed in NORT do not seem to be associated with differences in locomotor activity, as total distance travelled in the open field (Table 2) was not affected by either corticosterone ($F_{1,31} = 2.028$, $p > 0.05$) or propranolol treatment ($F_{1,31} = 0.814$, $p > 0.05$). In addition, as shown in Table 2, there was no difference in the discrimination index in the sample trial in the NORT associated with corticosterone ($F_{1,31} = 0.852$, $p > 0.05$) or propranolol treatment ($F_{1,31} = 0.876$, $p > 0.05$).

Propranolol decreases A β burden in corticosterone-treated mice

Mice treated with corticosterone exhibited significantly increased hippocampal levels of A β_{42} , and propranolol treatment was able to reverse this effect (two-way ANOVA, significant corticosterone \times propranolol interaction; $F_{1,27} = 4.536$, $p < 0.05$), as can be seen in Fig. 2a.

The lowering effects of propranolol on A β burden could be related to both a decrease in the production or to an increase in the clearance of A β . No differences were found among the different experimental groups in the expression of BACE1, the β -secretase responsible for A β cleavage from amyloid precursor protein (APP; two way

Table 2. Locomotor activity and object preference in the sample phase of the novel object recognition test

	Locomotor activity (cm)	Discrimination index
Saline	4917.29 \pm 306.14	52.92 \pm 7.02
Prop	5011.75 \pm 389.93	53.62 \pm 3.79
Cort	3941.38 \pm 407.59	47.44 \pm 7.21
Prop + Cort	4577.80 \pm 544.68	51.61 \pm 6.08

Prop, Propranolol; Cort, corticosterone.

Discrimination index: time exploring one of the objects/total exploration time \times 100. There were no significant differences (two-way analysis of variance Cort \times Prop) in any of the measurements.

ANOVA; $F_{1,27} = 0.255$, $p > 0.05$, Fig. 2b), suggesting that production of A β is not affected by either corticosterone or propranolol treatment. The expression of the two major proteases responsible for A β clearance in the brain, insulin degrading enzyme (IDE) and neprilysin, were measured (Fig. 2c, d). It was found that corticosterone administration lowered IDE expression (two way ANOVA, main effect of corticosterone; $F_{1,27} = 6.627$, $p < 0.05$), while propranolol treatment was able to increase IDE expression, independently of corticosterone (main effect of treatment; $F_{1,27} = 5.865$, $p < 0.05$). Neprilysin expression was not affected by either corticosterone or propranolol treatment.

Effects of propranolol on corticosterone treatment on insulin and insulin-triggered are reversed by propranolol treatment: implications in tau pathology

Peripheral insulin levels were increased after corticosterone administration and propranolol was able to reverse this increase (two way ANOVA, significant interaction; $F_{1,31} = 4.931$, $p < 0.05$, Scheffe's test, $p < 0.05$, Fig. 3a) Decreased activation of insulin receptor (pIR) was found in corticosterone-treated mice and propranolol was again able to reverse this effect (two way ANOVA, significant interaction; $F_{1,31} = 5.986$, $p < 0.05$, Scheffe's test, $p < 0.01$, Fig. 3b).

One of the main intracellular pathways mediated by insulin-receptor activation is the PI3K/Akt/GSK3 β pathway. There was a main effect of corticosterone and propranolol treatment regarding activation of Akt (pAkt; main effect of corticosterone; $F_{1,27} = 4.637$, $p < 0.05$; main effect of propranolol; $F_{1,27} = 7.274$, $p < 0.05$; Fig. 3c). GSK3 β , which is inactivated by phosphorylation by pAkt, was found to be decreased after corticosterone treatment. Propranolol increased expression of the inactive form of GSK3 β (two way ANOVA, main effect of corticosterone; $F_{1,27} = 5.049$, $p < 0.05$; main effect of propranolol $F_{1,27} = 7.262$, $p < 0.05$; Fig. 3d). GSK3 β is responsible for phosphorylating Ser³⁹⁶/Ser⁴⁰⁴ of tau protein (PHF-1 antibody; Davies, 2000). A significant corticosterone \times propranolol treatment interaction was found (Fig. 3e)

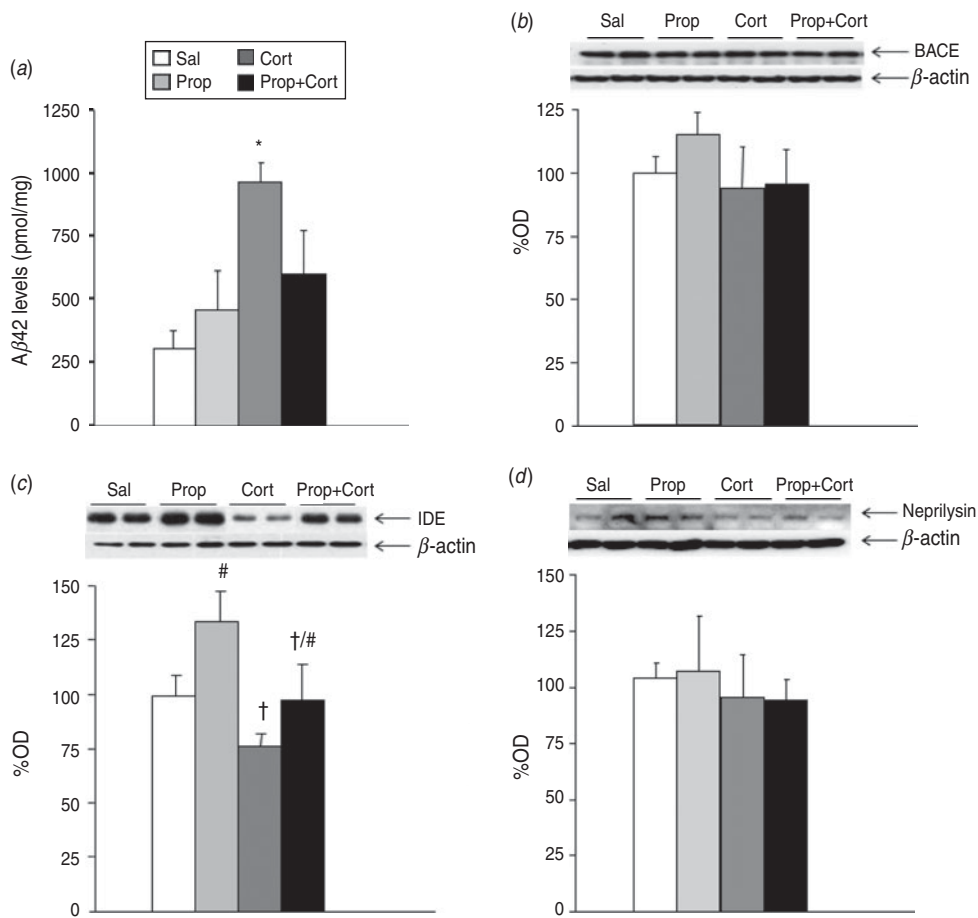


Fig. 2. Propranolol (Prop) decreases A β burden in corticosterone (Cort)-treated mice. (a) Increased levels of A β in the hippocampus of Cort-treated mice were counteracted by Prop treatment; (b) expression of BACE1; (c) expression of insulin degrading enzyme (IDE); (d) expression of neprilysin. (b–d), Representative Western blot bands from hippocampal tissues are shown. The histograms represent the quantification of the immunohistochemically reactive bands in the Western blot. Data are expressed as mean percentage of the results from control mice receiving saline (Sal). Statistical analysis using two-way analysis of variance (Cort \times Prop), * $p < 0.05$ vs. control Sal-treated, † $p < 0.05$, main effect of Cort, # $p < 0.05$ main effect of Prop. OD, Optical density.

and the increased expression of pTau in corticosterone-treated mice was reversed by propranolol (two-way ANOVA, significant interaction; $F_{1,31} = 4.191$, $p < 0.05$, Scheffe's test, $p < 0.05$).

As for the mechanisms responsible for insulin resistance in corticosterone-treated mice, it has been described that the stress-activated kinase c-Jun N terminal kinase 1 (JNK1) phosphorylates the insulin receptor substrate 1 at an inhibitory site that can block signal transduction by the insulin receptor. As shown in Fig. 3f, there was a significant increase in levels of phosphorylated JNK1 (pJNK1) in corticosterone-treated mice (main effect of corticosterone; $F_{1,27} = 7.755$, $p < 0.01$), while treatment with propranolol was able to decrease pJNK1 expression (main effect of propranolol; $F_{1,27} = 5.438$, $p < 0.05$).

Consistent with a post-transcriptional regulation of these enzymes, total insulin receptor, Akt, GSK3 β , tau and JNK1 levels, normalized using actin, remained unaltered.

Discussion

Propranolol, a β -adrenergic antagonist that is commonly used in the treatment of hypertension, cardiac arrhythmia, angina pectoris or acute anxiety has been shown experimentally to decrease A β levels *in vitro* (Wang et al., 2007). Due to the purported involvement of glucocorticoids in AD, the present work aimed to test whether propranolol could ameliorate memory impairments and amyloid pathology in a model of chronic glucocorticoid treatment. The experimental model chosen was taken from that described by Karatsoreos et al. (2010). This is a non-invasive method of administration of corticosterone in drinking water that has been described to model many of the physiological and behavioural effects observed in hypercortisolaemia in humans.

Effects on cognition

Chronic elevation of circulating corticosterone concentrations by stress, systemic administration of

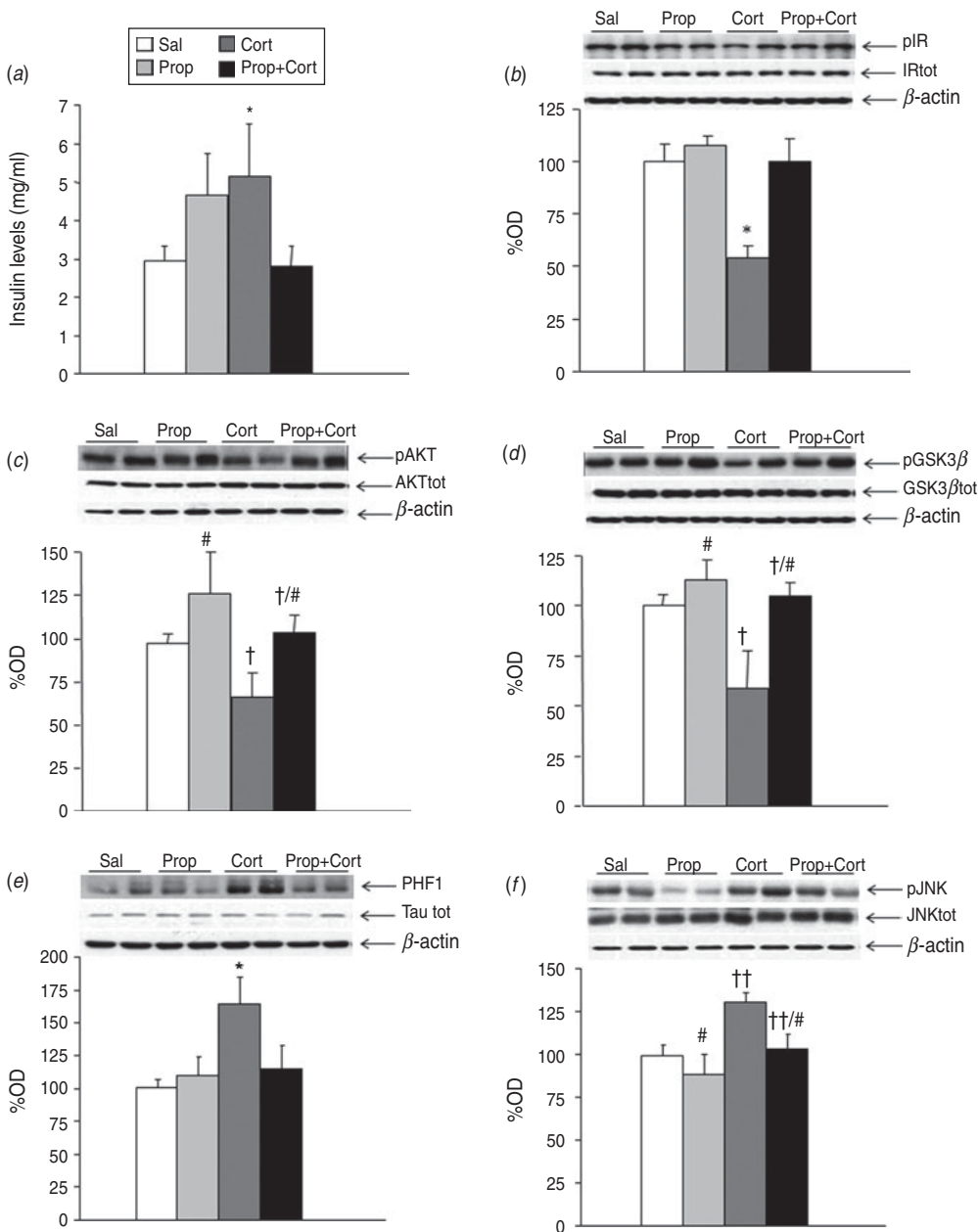


Fig. 3. Propranolol (Prop) reverses the effects of corticosterone (Cort) on insulin related pathways. (a) Insulin levels; (b) activation of insulin receptor (pIR); (c) pAkt expression; (d) phosphorylated glycogen synthase kinase 3 β (pGSK3 β ; inactive form); (e) pTau (PHF-1 antibody); (f) phosphorylated c-Jun N terminal kinase 1 (pJNK1). The histograms represent the quantification of the immunochemically reactive bands in the Western blot. Data are expressed as mean percentage of the results from control mice receiving saline (Sal). Statistical analysis using two-way analysis of variance (Cort \times Prop), * $p < 0.05$ vs. control Sal-treated, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ main effect of Cort, # $p < 0.05$ main effect of Prop. OD, Optical density.

corticosterone or glucocorticoid receptor agonists exerts an inhibitory influence on learning and memory (Roosendaal et al., 2004b, c; Aisa et al., 2007; Abercrombie et al., 2011). As the hippocampus is important for mediating glucocorticoid effects on memory and receives a dense input of noradrenergic terminals (Schroeter et al., 2000), glucocorticoids may interact with hippocampal noradrenergic mechanisms in influencing memory (Kim and Diamond, 2002; Maroun and Richter-Levin, 2003). It has been shown that systemic

administration of propranolol blocks the impairing effect of corticosterone on working memory (Fuster, 1991). Moreover, propranolol, infused into the hippocampus, prevents the impairing effect of concurrent intra-hippocampal administration of a glucocorticoid receptor agonist on memory retrieval (Roosendaal et al., 2004a). Propranolol has also been shown to reverse cognitive deficits associated with chronic stress (Aisa et al., 2007). Our finding that propranolol administration alone did not affect cognitive performance appears to support other

previous studies in literature (Roozendaal et al., 2004a), although it seems in conflict with others reporting systemic propranolol impaired memory retrieval on a water maze spatial task (Murchison et al., 2004). In this regard, it has been suggested that the retention-enhancing effects of increased noradrenergic tone may be caused by influences on mechanisms other than memory retrieval, e.g., non-specific effects on arousal and attention (Aston-Jones et al., 2000).

Propranolol decreases A β burden, probably through an increased IDE expression

AD is characterized by the progressive accumulation in the brain of senile plaques composed of A β . The principal constituent of amyloid plaques observed in AD is A β , which is generated from APP. APP can be cleaved by β -secretase (BACE1) and α -secretase to produce C99 and C83. These C-terminal fragments can then be cleaved by γ -secretase to produce A β and p3, respectively. According to the amyloid hypothesis (Hardy and Selkoe, 2002), accumulation of A β in the brain is the primary influence leading to AD pathogenesis. It is proposed that this accumulation results from an imbalance between A β production and A β clearance. In our hands, due to the lack of effect of either corticosterone or propranolol treatment on BACE1 expression, it seems that the increased A β levels in corticosterone-treated mice could be derived from a decreased degradation. Two enzymes are considered to be mainly responsible for A β degradation in brain tissue, IDE and neprilysin (Farris et al., 2003; Leissring et al., 2003). Our results suggest that the lowering effects of propranolol of A β levels are associated with an increased IDE expression. Early studies supported such a relationship and revealed reduced IDE mRNA and protein immunolabelling in AD compared to control brains (Akiyama et al., 2001; Russo et al., 2005; Miners et al., 2006; Wang et al., 2010). It has also been shown that knockout IDE mice present a lower degradation of A β (Farris et al., 2003). In this same line, it could be suggested that the mechanism by which propranolol could decrease A β burden is through an increase in IDE expression.

Corticosterone treatment leads to alterations in the insulin receptor pathway that are reversed by propranolol

It is becoming increasingly evident that alterations in glucocorticoids can result in numerous metabolic changes. There are numerous connections between alterations in glucocorticoids and incidence of the metabolic syndrome, which leads to greater risk of diabetes. Exposure to elevated levels of glucocorticoids produces physiological responses that are characteristic of type 2 diabetes, such as peripheral insulin resistance, and corticosterone administration has been shown to impair insulin signalling in the rat hippocampus (Piroli et al., 2007).

Glucocorticoid excess has been described to result in insulin resistance by blunting insulin's action to suppress hepatic glucose production and stimulate peripheral glucose utilization (Amatruda et al., 1985). Accordingly, chronic exposure to glucocorticoids induces physiological responses that are characteristic of insulin resistance, shown presently as increased peripheral insulin levels, decreased activation of the insulin receptor (pIR) and decreased associated intracellular pathways (pAkt). Among the different mechanisms that have been suggested to be responsible for this insulin resistance (Amatruda et al., 1985), our results point to a central role of JNK1, a member of the MAPK family (Kyriakis, 1999). JNK1 plays a key role in central stress signalling pathways implicated in neuronal plasticity and cell death (Kögel et al., 2005; Maruyama et al., 2009). JNK1 may directly induce insulin resistance (Weston and Davis, 2007), as JNK1 phosphorylates the insulin receptor substrate 1 at an inhibitory site that can block signal transduction by the insulin receptor (Sabio et al., 2008). In addition, Akt and tau have been shown to be important substrates of JNK1 (Bogoyevitch and Kobe, 2006). On the other hand, the increased IDE expression could result in a normalization of insulin levels in corticosterone-treated mice after propranolol. Therefore, propranolol, either by acting upon pJNK or by increasing IDE expression, could result in an activation of insulin receptor associated pathways.

The main intracellular pathway associated with insulin receptor activation is the Akt-GSK3 β -tau pathway. Abnormal hyperphosphorylation of tau is a critical event in the cascade leading to AD pathology. Glucocorticoids are the physiological effectors of responses to stress. Previous studies have reported the association between the hyperphosphorylation of tau and stress and stress-activated kinases (Sotiropoulos et al., 2011). Repeated stress exposure elicited cumulative effects on pTau and its sequestration in an insoluble, and potentially pathogenic, form (Rissman et al., 2007). Solas et al. (2010) showed that stressed aged rats showed significant increases in both pTau levels and activation of GSK3 β . It has also been described recently that chronic mild stress produces an increase in hippocampal phospho-tau levels on a background of AD susceptibility (Cuadrado-Tejedor et al., 2012). From our results it seems that, through dysregulation of GSK3 β , a dysfunction of the insulin receptor facilitates tau hyperphosphorylation (Schubert et al., 2004), which forms neurofibrillary tangles in AD. Supporting our data, Sotiropoulos et al. (2011) have recently shown that chronic stress and glucocorticoids induce abnormal hyperphosphorylation of tau. In addition to GSK3 β , among kinases implicated in tau pathology, data on activation of JNK1 seems of particular interest. Activation of JNK1 phosphorylates tau at sites recognized by PHF-1 antibody (Bellucci et al., 2007). Therefore, both GSK3 β and JNK1 could be contributing to the hyperphosphorylation of tau. The present results do

not preclude changes in other kinases or changes phosphorylation sites other than those recognized by the PHF-1 antibody. Based on clinical studies reporting a strong correlation between the extent of tau hyperphosphorylation and severity of impairments of memory (Ewers et al., 2007; van der Vlies et al., 2009), it could be speculated that the effects of propranolol on tau phosphorylation could contribute to the reversal of memory deficits in corticosterone-treated mice.

Conclusions

As a final comment, it should be noted that propranolol was used in the present study at a lower dose than commonly used for the treatment of hypertension. Therefore, the results presented here seem to be independent from the antihypertensive effect of propranolol. Based on the present results, it could be concluded that propranolol not only reversed cognitive deficits and increased A β levels associated with chronic corticosterone administration, it also reversed tau pathology, probably through a modulation of JNK1 activity. It is becoming increasingly evident that alterations in glucocorticoids can result in numerous metabolic changes and there are connections between alterations in glucocorticoids and incidence of metabolic syndrome (Vogelzang and Penninx, 2007; Muhtz et al., 2009), which leads to greater risk of diabetes. Taking into account that both glucocorticoids and diabetes/insulin resistance are considered to be important risk factors for developing AD, the present results encourage further studies of approaches to the treatment of such pathologies based on propranolol.

Acknowledgements

This work has been supported by a grant from FIS (10/01748) and 'Tu eliges, Tu decides' projects of CAN.

Statement of Interest

None.

References

- Abercrombie HC, Jahn AL, Davidson RJ, Kern S, Kirschbaum C, Halverson J (2011). Cortisol's effects on hippocampal activation in depressed patients are related to alterations in memory formation. *J Psychiatr Res* 45:15–23.
- Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32:256–266.
- Aisen PS, Davis KL, Berg JD, Schafer K, Campbell K, Thomas RG, Weiner MF, Farlow MR, Sano M, Grundman M, Thal LJ (2000). A randomized controlled trial of prednisone in Alzheimer's disease. Alzheimer's disease cooperative study. *Neurology* 54:588–593.
- Akiyama H, Kondo H, Ikeda K, Kato M, McGeer PL (2001). Immunohistochemical localization of neprilysin in the human cerebral cortex: inverse association with vulnerability to amyloid beta-protein (A β) deposition. *Brain Res* 902:277–281.
- Amatruda JM, Livingston JN, Lockwood DH (1985). Cellular mechanisms in selected states of insulin resistance: human obesity, glucocorticoid excess, and chronic renal failure. *Diabetes Metab Rev* 1:293–317.
- Aston-Jones G, Rajkowski J, Cohen J (2000). Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention. *Prog Brain Res* 126:165–182.
- Bellucci A, Rosi MC, Grossi C, Fiorentini A, Luccarini I, Casamenti F (2007). Abnormal processing of tau in the brain of aged TgCRND8 mice. *Neurobiol Dis* 27:328–338.
- Bogoyevitch M.A, Kobe B (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:1061–1095.
- Carroll JC, Iba M, Bangasser DA, Valentino RJ, James MJ, Brunden KR, Lee VM, Trojanowski JQ (2011). Chronic stress exacerbates tau pathology, neurodegeneration, and cognitive performance through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism in a transgenic mouse model of tauopathy. *J Neurosci* 31:14436–14449.
- Catania C, Sotiropoulos I, Silva R, Onofri C, Breen KC, Sousa N, Almeida OF (2009). The amyloidogenic potential and behavioral correlates of stress. *Mol Psychiatry* 14:95–105.
- Coluccia D, Wolf OT, Kollias S, Roozendaal B, Forster A, de Quervain DJ (2008). Glucocorticoid therapy-induced memory deficits: acute vs. chronic effects. *J Neurosci* 28:3474–3478.
- Csernansky JG, Dong H, Fagan AM, Wang L, Xiong C, Holtman DM, Morris JC (2006). Plasma cortisol and progression of dementia in subjects with Alzheimer-type dementia. *Am J Psychiatry* 163:2164–2169.
- Cuadrado-Tejedor M, Ricobaraza A, Frechilla D, Franco R, Pérez-Mediavilla A, Garcia-Osta A (2012). Chronic mild stress accelerates the onset and progression of the Alzheimer's disease phenotype in Tg2576 mice. *J Alzheimers Dis* 28:567–578.
- Davies P (2000). Characterization and use of monoclonal antibodies to tau and paired helical filament tau. *Methods Mol Med* 32:361–373.
- Dobarro M, Orejana L, Aguirre N, Ramírez MJ (2012). Propranolol restores cognitive deficits and improves amyloid and tau pathologies in a senescence-accelerated mouse model. *Neuropharmacology* 64:137–144.
- Elgh E, Lindqvist Astot A, Fagerlund M, Eriksson S, Olsson T, Näsman B (2006). Cognitive dysfunction, hippocampal atrophy and glucocorticoid feedback in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 59:155–161.
- Ennaceur A, Delacour J (1988). A new one trial-test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47–59.
- Ewers M, Buerger K, Teipel SJ, Scheltens P, Schröder J, Zinkowski RP, Bouwman FH, Schönknecht P, Schoonenboom NS, Andreasen N, Wallin A, DeBernardis JF, Kerkman DJ, Heindl B, Blennow K, Hampel H (2007). Multicenter assessment of CSF-phosphorylated tau for the prediction of conversion of MCI. *Neurology* 69:2205–2212.
- Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor

- protein intracellular domain *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 100:4162–4167.
- Flood JF, Morley JE (1998). Learning and memory in the SAMP8 mouse. Neurosci Biobehav Rev 22:1–20.
- Fuster JM (1991). The prefrontal cortex and its relation to behavior. Prog Brain Res 87:201–211.
- Gil-Bea FJ, Aisa B, Solomon A, Solas M, del Carmen Mugueta M, Winblad B, Kivipelto M, Cedazo-Minguez A, Ramirez MJ (2010). HPA axis dysregulation associated to apolipoprotein E4 genotype in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 22:829–838.
- Green KN, Billings LM, Roozendaal B, McGaugh JL, LaFerla FM (2006). Glucocorticoids increase amyloid-beta and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. J Neurosci 26:9047–9056.
- Guo Z, Viitanen M, Winblad B, Fratiglioni L (1999). Low blood pressure and incidence of dementia in a very old sample: dependent on initial cognition. J Am Geriatr Soc 47:723–726.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science 297:353–356.
- Jeong YH, Park CH, Yoo J, Shin KY, Ahn SM, Kim HS, Lee SH, Emson PC, Suh YH (2006). Chronic stress accelerates learning and memory impairments and increases amyloid deposition in APPV717I-CT100 transgenic mice, an Alzheimer's disease model. FASEB J 20:729–731.
- Julien C, Tremblay C, Phivilay A, Berthiaume L, Emond V, Julien P, Calon F (2010). High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3 × Tg-AD mouse model. Neurobiol Aging 31:1516–1531.
- Kang JE, Cirrito JR, Dong H, Csernansky JG, Holtzman DM (2007). Acute stress increases interstitial fluid amyloid-beta via corticotropin-releasing factor and neuronal activity. Proc Natl Acad Sci USA 104:10673–10678.
- Karatsoreos IN, Bhagat SM, Bowles NP, Weil ZM, Pfaff DW, McEwen BS (2010). Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse. Endocrinology 151:2117–2127.
- Kim JJ, Diamond DM (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. Nat Rev Neurosci 3:453–462.
- Kögel D, Schomburg R, Copanaki E, Prehn JH (2005). Regulation of gene expression by the amyloid precursor protein: inhibition of the JNK/c-Jun pathway. Cell Death Differ 12:1–9.
- Kyriakis JM (1999). Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. J Biol Chem 274:5259–5262.
- Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, Frosch MP, Selkoe DJ (2003). Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. Neuron 40:1087–1093.
- Maroun M, Richter-Levin G (2003). Exposure to acute stress blocks the induction of long-term potentiation of the amygdala-prefrontal cortex pathway *in vivo*. J Neurosci 23:4406–4409.
- Maruyama J, Naguro I, Takeda K, Ichijo H (2009). Stress-activated MAP kinase cascades in cellular senescence. Curr Med Chem 16:1229–1235.
- Miners JS, Van Helmond Z, Chalmers K, Wilcock G, Love S, Kehoe PG (2006). Decreased expression and activity of neprilysin in Alzheimer disease are associated with cerebral amyloid angiopathy. J Neuropathol Exp Neurol 65:1012–1021.
- Morley JE, Farr SA, Kumar VB, Armbrecht HJ (2012). The SAMP8 mouse: a model to develop therapeutic interventions for Alzheimer's disease. Curr Pharm Des 18:1123–1130.
- Muhtz C, Zyriax BC, Klähn T, Windler E, Otte C (2009). Depressive symptoms and metabolic risk: effects of cortisol and gender. Psychoneuroendocrinology 34:1004–1011.
- Murchison CF, Zhang XY, Zhang WP, Ouyang M, Lee A, Thomas SA (2004). A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. Cell 117:131–143.
- Ownby RL, Crocco E, Acevedo A, John V, Loewenstein D (2006). Depression and risk for Alzheimer disease: systematic review, meta-analysis, and meta regression analysis. Arch Gen Psychiatry 63:530–538.
- Piroli GG, Grillo CA, Reznikov LR, Adams S, McEwen DS, Charron MJ, Reagan LP (2007). Corticosterone impairs insulin-stimulated translocation of GLUT4 in the rat hippocampus. Neuroendocrinology 85:71–80.
- Ploj K, Roman E, Nylander I (2003). Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. Neuroscience 121:787–799.
- Popp J, Schaper K, Kölsch H, Cvetanovska G, Rommel F, Klingmüller D, Dodel R, Wüllner U, Jessen F (2009). CSF cortisol in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Neurobiol Aging 30:498–500.
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2007). Dose translation from animal to human studies revisited. FASEB J 22:659–661.
- Rissman RA, Lee KF, Vale W, Sawchenko PE (2007). Corticotropin-releasing factor receptors differentially regulate stress-induced tau phosphorylation. J Neurosci 27:6552–6562.
- Roozendaal B, de Quervain DJ, Schelling G, McGaugh JL (2004a). A systemically administered beta-adrenoceptor antagonist blocks corticosterone-induced impairment of contextual memory retrieval in rats. Neurobiol Learn Mem 81:150–154.
- Roozendaal B, Hahn EL, Nathan SV, de Quervain DJ, McGaugh JL (2004b). Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. J Neurosci 24:8161–8169.
- Roozendaal B, McReynolds JR, McGaugh JL (2004c). The basolateral amygdala interacts with the medial prefrontal cortex in regulating glucocorticoid effects on working memory impairment. J Neurosci 24:1385–1392.
- Roozendaal B, Okuda S, de Quervain DJ, McGaugh JL (2006). Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. Neuroscience 138:901–910.
- Russo R, Borghi R, Markesbery W, Tabaton M, Piccini A (2005). Neprilysin decreases uniformly in Alzheimer's disease and in normal aging. FEBS Lett 579:6027–6030.
- Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko HJ, Barrett T, Kim JK, Davis RJ (2008). A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. Science 322:1539–1543.
- Schroeter S, Apparsundaram S, Wiley RG, Miner LH, Sesack SR, Blakely RD (2000). Immunolocalization of the cocaine- and antidepressant-sensitive 1-norepinephrine transporter. J Comp Neurol 420:211–232.

- Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D, Kondo T, Alber J, Galldiks N, Küstermann E, Arndt S, Jacobs AH, Krone W, Kahn CR, Brüning JC (2004). Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3100–3105.
- Solas M, Aisa B, Mugueta MC, Del Río J, Tordera RM, Ramírez MJ (2010). Interactions between age, stress and insulin on cognition: implications for Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 35:1664–1673.
- Sotiropoulos I, Catania C, Riedemann T, Fry JP, Breen KC, Michaelidis TM, Almeida OF (2008a). Glucocorticoids trigger Alzheimer disease-like pathobiochemistry in neuronal cells expressing human tau. *J Neurochem* 107:385–397.
- Sotiropoulos I, Cerqueira JJ, Catania C, Takashima A, Sousa N, Almeida OF (2008b). Stress and glucocorticoid footprints in the brain—the path from depression to Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1161–1173.
- Sotiropoulos I, Catania C, Pinto LG, Silva R, Pollerberg GE, Takashima A, Sousa N, Almeida OF (2011). Stress acts cumulatively to precipitate Alzheimer's disease-like tau pathology and cognitive deficits. *J Neurosci* 31:7840–7847.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos Jr. L, Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994). An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264:1336–1340.
- Takeda T (1999). Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiol Aging* 20:105–110.
- van der Vlies AE, Verwey NA, Bouwman FH, Blankenstein MA, Klein M, Scheltens P, van der Flier WM (2009). CSF biomarkers in relationship to cognitive profiles in Alzheimer disease. *Neurology* 72:1056–1061.
- Vogelzangs N, Penninx BW (2007). Cortisol and insulin in depression and metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology* 32:856.
- Wang J, Ho L, Chen L, Zhao Z, Zhao W, Qian X, Humala N, Seror I, Bartholomew S, Rosendorff C, Pasinetti GM (2007). Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 117:3393–3402.
- Wang F, Shu C, Jia L, Zuo X, Zhang Y, Zhou A, Qin W, Song H, Wei C, Zhang F, Hong Z, Tang M, Wang DM, Jia J (2010). Exploration of 16 candidate genes identifies the association of IDE with Alzheimer's disease in Han Chinese. *Neurobiol Aging* 33:1–9.
- Weston CR, Davis RJ (2007). The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19:142–149.
- Wilson RS, Barnes LL, Bennett DA, Li Y, Bienias JL, Mendes de Leon CF, Evans DA (2005). Proneness to psychological distress and risk of Alzheimer disease in a biracial community. *Neurology* 64:380–382.

Capítulo VI

Capítulo 6

Discusión

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que afecta a 37 millones de personas a nivel mundial (OMS, 2005). Debido al envejecimiento de la población, se estima que su incidencia superará los 100 millones de afectados en el año 2050. En términos económicos, la EA se considera la tercera enfermedad más costosa detrás de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, con un coste medio anual calculado por paciente de EA en España de aproximadamente 19.000 €. Este gasto crece de forma exponencial a medida que la enfermedad progresa por lo que cualquier terapia que consiguiese ralentizar la progresión de la enfermedad podría repercutir significativamente en los costes de la misma. Se ha estimado (Ziegler-Graham y col., 2008) que si fuera posible retrasar el desarrollo de la enfermedad un año, la prevalencia se reduciría en 12 millones menos de casos a nivel mundial en el año 2050. Todo esto, unido a la ausencia de un tratamiento curativo para la enfermedad, justifica la necesidad de investigar sobre los procesos patológicos que se producen durante la misma, intentando así, con los conocimientos adquiridos determinar dianas terapéuticas que puedan estimular el desarrollo de nuevos fármacos que constituyan un tratamiento curativo de la EA.

Además de la edad, que es el principal factor de riesgo para desarrollar la EA, la implicación de distintos factores de riesgo ambientales en el desarrollo de la enfermedad ha sido descrita, entre los que destacan los cardiovasculares. La hipertensión arterial es el factor de riesgo cardiovascular de mayor prevalencia, ya que el 45% de la población mundial presenta cifras de presión arterial iguales o superiores a 140 mmHg (Lawes y col., 2006). Como se describe ampliamente en el punto 2 de la Introducción, estudios epidemiológicos señalan la existencia de una relación inversa entre la presión arterial y la función cognitiva (Starr y col., 1993; Seux y col., 1998; Hanon y col., 2005; Peila y col., 2006), y cifras elevadas de presión arterial en el individuo adulto y la aparición de EA en las edades más avanzadas (Kivipelto y col., 2001). Además, desde un punto de vista neuropatológico, existen datos que demuestran que la hipertensión podría estar involucrada en la acumulación de depósitos de A β y la formación de ONFs (Lee y col., 2003; Bomboi y col., 2010). Se ha postulado que la disminución endotelial y microvascular propia de esta situación se asocia a un peor aclaramiento del péptido A β (Knopman, 2009).

Apoyando la implicación de la hipertensión, hay estudios que muestran una relación entre la administración de tratamiento antihipertensivo y una menor probabilidad de presentar deterioro cognitivo, incluyendo EA (Murray y col., 2002; Peila y col., 2006; Hanon y col., 2006; Khachaturian y col., 2006). Sin embargo, este es un punto controvertido, ya que también hay trabajos que no logran encontrar esta relación (Guo y col., 1999; in't Veld y col., 2001; Hebert y col., 2004).

Esta falta de consenso puede estar relacionada con un efecto diferencial de los distintos fármacos antihipertensivos sobre la patología de la EA. Relacionado con esto, cabe destacar el trabajo de Wang y col. (2007), en el que se estudiaron 55 fármacos antihipertensivos con distintos mecanismos de acción. De entre todos ellos, solo 7 fueron capaces de disminuir *in vitro* la carga de β -amiloide, entre ellos el propranolol (Wang y col., 2007). Por lo tanto, pudiera sugerirse que algunos fármacos antihipertensivos podrían ser capaces de revertir la patología amiloide.

El propranolol es antagonista β -adrenérgico no selectivo ampliamente utilizado para tratar la presión arterial elevada, ansiedad y otras patologías cardiovasculares. La hipótesis de trabajo fue que el propranolol es capaz de actuar sobre la patología amiloide y por ende, sobre la patología cognitiva en la enfermedad de Alzheimer, y que además, sus efectos son independientes del efecto antihipertensivo.

Siguiendo esta hipótesis, la dosis utilizada en este trabajo corresponde a una dosis por debajo de las utilizadas habitualmente en el tratamiento de la hipertensión arterial en humanos (160 mg/día-320 mg/día). La dosis de propranolol utilizada (5 mg/kg) equivaldría a una dosis de 24,3 mg/día en una persona adulta de unos 60 kg, según la siguiente fórmula (Reagan-Shaw y col., 2007):

$$\text{DHE (mg/kg)} = \text{Dosis animal (mg/kg)} \times \frac{\text{Km animal}}{\text{Km humano}}$$

Figura 1. Fórmula de conversión de dosis animales a dosis equivalentes humanas. DHE: dosis equivalente humana. Km de ratón=3; Km de humano=37 (Adaptado de Reagan-Shaw y col., 2007).

Por otro lado, y debido a que hasta ahora no se ha conseguido un buen modelo experimental que recopile todas las características de la EA, en el presente trabajo se emplearon 3 modelos experimentales distintos: un modelo de envejecimiento (modelo de los ratones SAMP8), un modelo genético (modelo transgénico Tg2576) y un modelo de factor de riesgo ambiental (modelo de estrés por elevación de los niveles de glucocorticoides). La edad de los animales se decidió en función de la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad según ha sido descrito en la bibliografía para cada uno de los modelos. Esta elección está de acuerdo con una idea muy extendida en la actualidad que afirma que tanto el diagnóstico como el comienzo del tratamiento farmacológico de la EA tienen lugar demasiado tarde en los pacientes afectados (Haas y col., 2012). Por lo tanto, en los distintos modelos experimentales se eligió la edad en que comienza la patología amiloide y cognitiva. A continuación se describen las características más importantes de los distintos modelos experimentales empleados.

Modelo animal de envejecimiento: ratones de senescencia acelerada (SAMP8)

Los ratones SAMP8 son considerados en la actualidad un modelo animal robusto para el estudio de patologías asociadas a la edad, incluyendo la EA (Pallas y col., 2008; Liu y col., 2010; Sureda y col., 2006), ya que son capaces de mimetizar la naturaleza multifactorial de la enfermedad mucho mejor que los modelos transgénicos (Pang y col., 2006). Diversos trabajos han descrito que estos ratones SAMP8 presentan déficit en el aprendizaje y la memoria a partir de los 5 meses de edad, así como depósitos cerebrales de A β (Tomobe y Nomura, 2009; Del Valle y col., 2010) que van aumentando con la edad en número y extensión (Del Valle y col., 2010). De la misma manera se ha descrito la presencia de Tau hiperfosforilada en el ratón SAMP8 a los 5 meses de edad, y esta hiperfosforilación se ha relacionado directamente con la degeneración neurofibrilar y la aceleración del envejecimiento característico de estos ratones (Canudas y col., 2005; Sureda y col., 2006; García-Matas y col., 2008). Sin embargo no hay constancia de la aparición de placas antes de los 18 meses (Morley y col., 2000). Por estas razones, y tal como se ha explicado anteriormente en la presente discusión, se han elegido la edad de 6 meses para el presente trabajo, edad a partir de la cual empieza a depositarse el péptido A β y aparecen los

primeros síntomas del deterioro cognitivo. Se ha llevado a cabo un estudio piloto adicional para comprobar si el propranolol mantenía su capacidad de revertir también los déficits cognitivos observados en ratones SAMP8 en edades más avanzadas (9 meses), en las que las alteraciones de memoria son significativamente mayores (Pallas y col., 2008).

Modelo animal transgénico de EA: ratones Tg2576

Tal y como se ha explicado en el punto 1.2 de la Introducción, se estima que entre un 1 y un 5% de los casos de EA es de origen hereditario, y en estos casos el factor genético parece ser el principal responsable de la enfermedad. Hasta el momento se han identificado 3 mutaciones que la causan: en el cromosoma 21, concretamente en el gen que codifica la proteína precursora del β -amiloide (APP); en el cromosoma 14, en el gen que codifica las presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2); y en el cromosoma 1, en el gen que codifica la PS2. En los 3 casos, las mutaciones tienen como consecuencia un aumento en la producción del péptido A β .

El modelo transgénico Tg2576 constituye uno de los modelos animales más utilizados y contrastados actualmente para el estudio de EA. Este ratón sobreexpresa la isoforma de 695 aminoácidos del gen de la APP humana conteniendo la doble mutación sueca (K670M/N671L), y muestra signos de daño en el hipocampo a los 9 meses de edad, hecho que queda reflejado en el deterioro cognitivo que muestran en diferentes pruebas de comportamiento (Chapman y col., 1999; Westerman y col., 2002). La aparición de placas seniles comienza igualmente entorno a los 9 meses de edad (Irizarry y col., 1997) y aumenta exponencialmente con la edad, de forma que a los 16 meses la carga de amiloide alcanza una amplia parte del hipocampo. En base a todo esto, para el estudio de los ratones Tg2576 se han elegido animales de 9 meses, edad en la cual muestran alteraciones de memoria tanto en el NORT (Mouri y col., 2007; Taglialatela y col., 2009) como en el test de miedo condicionado (Jacobsen y col., 2006; Perez-Cruz y col., 2011), así como aumentos significativos del péptido A β .

Modelo animal de estrés: administración crónica de corticosterona

Existe una fuerte evidencia, proveniente tanto de estudios realizados en animales de experimentación como en estudios clínicos, de que la exposición al estrés crónico puede tener un papel importante en la etiología de diversas patologías neurodegenerativas (Kessler, 1997; Heim y Nemeroff, 1999; McEwen, 2002; Miller y O'Callaghan, 2005). En concreto, el estrés se considera como un factor de riesgo para el desarrollo y progresión de la EA (ver punto 1.1 de la presente Introducción), ya que se ha visto que es capaz de acelerar la aparición de placas de A β y el deterioro cognitivo en modelos animales de EA (Green y col., 2006; Jeong y col., 2006; Solas y col., 2010). Estudios recientes sugieren además que un estrés crónico conduce a la hiperfosforilación de Tau (Solas y col., 2010; Briones y col., 2012). Las respuestas al estrés en el organismo se caracterizan por una elevación de los glucocorticoides (corticosterona en modelos murinos) circulantes, y esta elevación es la considerada causante y origen de los efectos deletéreos del estrés.

El modelo de administración crónica de corticosterona elegido es el descrito por Karatsoreos y col. (2010). Según este modelo, se administró diariamente y durante 4 semanas en el agua de bebida una solución con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de corticosterona. Según lo descrito (Karatsoreos y col., 2010) este procedimiento consigue alterar los niveles plasmáticos de corticosterona de una manera no invasiva conservando la integridad del ritmo presente en los animales normales, al contrario que otras formas de administración de corticosterona (inyecciones o pellets).

En conjunto, a la vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo utilizando estos 3 modelos experimentales que se acaban de describir, se podría concluir que el propranolol ejerce un efecto protector frente a las alteraciones cognitivas presentes en los diferentes modelos, revirtiendo además los principales marcadores neuropatológicos de la EA (patología β -amiloide e hiperfosforilación de Tau). El mecanismo propuesto, aunque no ha podido ser del todo esclarecido, parece implicar una modulación tanto de la actividad de JNK1, como del enzima IDE.

Los principales resultados obtenidos pasan a ser discutidos con detalle a continuación.

1. Efectos del propranolol sobre los procesos cognitivos

De acuerdo con trabajos previamente publicados, se han encontrado en los 3 modelos utilizados alteraciones cognitivas en la prueba de reconocimiento del nuevo objeto, y estos déficits observados fueron revertidos tras el tratamiento crónico con propranolol. En el caso de los ratones SAMP8, esta reversión tuvo lugar tanto en los animales de 6 meses como en los de 9 meses de edad, donde la patología está completamente instaurada. Los mismos resultados se observaron en el test del miedo condicionado al que fueron sometidos los ratones Tg2576, donde la mejora cognitiva quedó reflejada por un aumento significativo del tiempo de inmovilidad en los animales tratados con respecto a los salinos. En los animales sometidos a estrés, el propranolol fue capaz de revertir los déficits inducidos por la corticosterona en la prueba del NORT utilizando el protocolo de 24 horas.

2. Efectos del propranolol sobre la patología amiloide

La EA se caracteriza por la acumulación progresiva en el cerebro de placas seniles, compuestas principalmente por A β . De acuerdo con la hipótesis de la cascada del amiloide, esta acumulación de A β es la causa principal que conduce a la patogénesis de la EA, y se postula que se debe a un desequilibrio entre la producción y el aclaramiento de A β . El A β se genera a partir de la proteína APP, que puede ser cortada por distintas secretasas BACE1 y α -secretasa, para producir C99 y C83. Estos fragmentos pueden ser cortados a su vez por la γ -secretasa para producir A β y P3 respectivamente. En ratones transgénicos para APP, la sobreexpresión de BACE1 aumenta la formación de A β (Fukomoto y col., 2002), mientras que en los ratones *knockout* para BACE1 la producción de A β es prácticamente nula (Luo y col., 2001; Bodendorf y col., 2002). Estos datos indican que la expresión de BACE1 juega un papel fundamental en la biosíntesis del péptido A β .

Por otro lado, IDE es la principal proteasa involucrada en la degradación de A β (Kurochkin et al., 1994; McDermott et al., 1997; Qiu et al., 1998; Vekrellis et al., 2000). Se ha sugerido que existe una disminución de la actividad de esta proteasa asociada a la edad, lo que podría contribuir a la acumulación de β -amiloide, particularmente en pacientes con EA tardía. Además, ratones *knockout* de IDE muestran una menor degradación de A β (Farris y col., 2003).

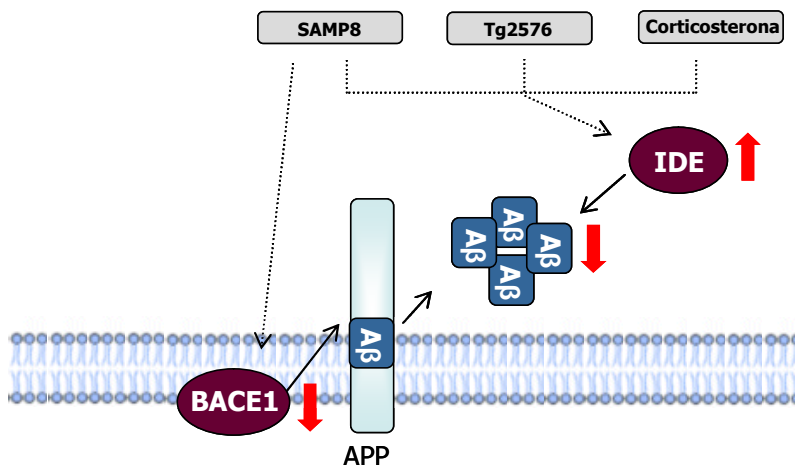


Figura 2. Efectos del propranolol sobre la patología amiloide. En los tres modelos el propranolol aumenta la expresión de IDE, lo que podría estar contribuyendo a un mayor aclaramiento de A β en el hipocampo. Además, en los ratones SAMP8 el propranolol también es capaz de contrarrestar el aumento de los niveles de BACE1 encontrados en estos animales. BACE1: β -secretasa; A β : péptido β -amiloide; APP: proteína precursora del β -amiloide; IDE: enzima degradadora de insulina.

En los 3 modelos animales utilizados se encontraron niveles elevados de A β_{42} con respecto a los controles, que fueron reducidos significativamente como consecuencia del tratamiento con propranolol. Se estudió si esta reducción de la carga amiloide puede tener lugar por una disminución de la producción de A β ó por un incremento de su aclaramiento. Aunque no se puede excluir completamente un aumento en el procesamiento amiloidogénico, el hecho de que tanto los ratones Tg2576 como los estresados no muestren cambios en los niveles de BACE1, junto con que no se encontraron cambios en la expresión del APP, parece indicar que el propranolol no altera la producción de β -amiloide. No ocurre lo mismo en los ratones SAMP8, donde sí se observan cambios en la expresión de esta secretasa que el propranolol fue capaz de contrarrestar. Por otro lado, para

comprobar el aclaramiento de A β , se midieron los niveles de IDE y los resultados obtenidos fueron muy semejantes en todos los casos: el propranolol fue capaz de aumentar la expresión de IDE, lo que podría estar contribuyendo a un mayor aclaramiento de A β en el hipocampo.

3. Efectos del propranolol sobre la patología de Tau

Junto con la acumulación de A β , la hiperfosforilación anormal de Tau es un evento crucial en la cascada que conduce a la patología de la EA (Grundke-Iqbal y col., 1986; Schneider y col., 1999; Kimura y col., 2007). Aunque tal y como se ha explicado en el punto 4 de la Introducción, ninguno de los modelos utilizados en el presente trabajo muestra una patología real de Tau en términos de ONFs, la existencia de Tau hiperfosforilada en diversos epítomos ha sido ampliamente descrita en ratones SAMP8 (Canudas y col., 2005; Orejana y col., 2011), ratones Tg2576 (Tomidokoro y col., 2001; Sasaki y col., 2002; Ferrer y col., 2005; Cuadrado-Tejedor y col., 2011) y en animales sometidos a estrés (Korneyev, 1998; El-faramawy y col., 2009), así como una mayor actividad de varias quinasas de Tau. De hecho, los aumentos en los niveles de β -amiloide pueden activar la vía de las quinasas de Tau mediante la fosforilación de GSK3 β en Tyr216 y como consecuencia se fosforila Tau en determinados sitios que promueven su depósito y acumulación (Tomidokoro y col., 2001; Otth y col., 2002). Estudios clínicos muestran una fuerte correlación entre la hiperfosforilación de Tau y la gravedad de los trastornos de la memoria (Ewers y col., 2007; van der Vlies y col., 2009).

En cuanto a las quinasas implicadas en la fosforilación de Tau, la activación de JNK1 parece ser de particular interés. JNK1 es un miembro de la familia de las MAPK que juega un papel fundamental en la plasticidad neuronal, muerte celular y regulación de la senescencia celular (Kögel y col., 2005, Maruyama y col., 2009). La activación de JNK1 fosforila Tau en sitios reconocidos por el anticuerpo PHF-1 (Ser396/Ser404) (Bellucci y col., 2007), pero además se ha descrito que esta enzima también fosforila al sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS1) en un sitio inhibitorio, de manera que es capaz de bloquear la cascada de señalización iniciada a través de dicho receptor (Sabio y col., 2008), alterando

como consiguiente la vía de Akt-GSK-Tau. Esta ruta Akt-GSK es indispensable para inducir la LTP, un proceso básico para el aprendizaje y la memoria (Van der Heide et al., 2006). En concordancia, en nuestros ratones tratados hemos encontrado que el tratamiento con propranolol lleva a una disminución de los niveles de JNK1, acompañados tanto por aumentos en pAkt y pGSK-3 β (forma inactiva), como por descensos de la expresión de pTau. Aún más, también se ha descrito que JNK1 media una regulación al alza de BACE1 (Tamango y col., 2005; 2009). Por lo tanto, la modulación de JNK1 por parte del propranolol en los ratones SAMP8, podría explicar los efectos encontrados tanto sobre la patología amiloide como sobre la neurofibrilar. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales el propranolol podría afectar a JNK1 no han sido esclarecidos.

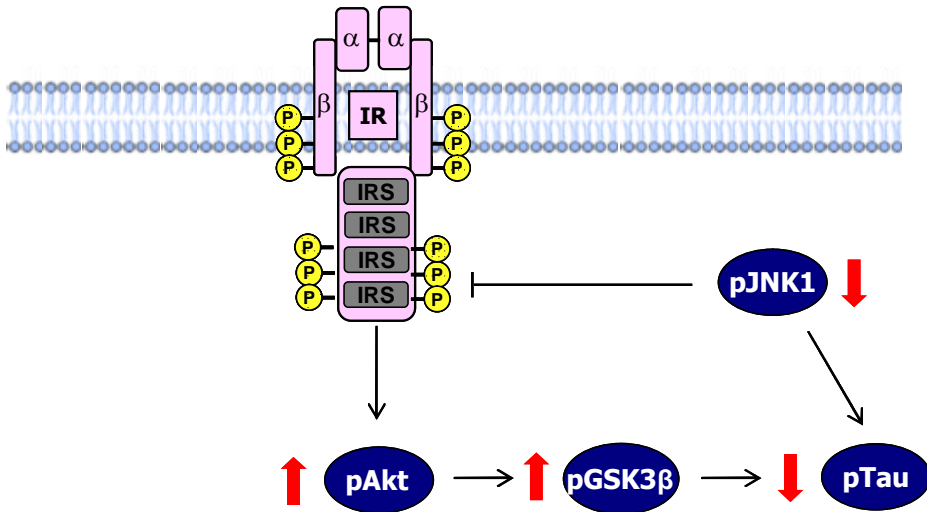


Figura 3. Efectos del propranolol sobre la patología de Tau. El propranolol es capaz de restablecer las alteraciones de la vía Akt-GSK-Tau observadas en los tres modelos animales posiblemente mediante la modulación de JNK1. Como consecuencia, se observa en todos los casos una disminución de los niveles de pTau. IR: receptor de insulina; IRS: sustrato del receptor de insulina; JNK1: quinasa N-terminal de la c-Jun; GSK3 β : quinasa glicógeno sintasa 3 β .

Otra consecuencia de la modulación de la actividad de JNK1 está relacionada con la insulina y su receptor. Este punto se ha estudiado y desarrollo particularmente en el modelo experimental de administración crónica de corticosterona. Una exposición a niveles elevados de glucocorticoides produce respuestas características de la diabetes

mellitus de tipo 2 como pueden ser la resistencia a la insulina. Así, se ha encontrado en ratones a los que se les ha administrado corticosterona parece existir una situación de resistencia a insulina, reflejada en un aumento de los niveles de insulina periférica, un descenso en la activación de los receptores de insulina (pIR) y la alteración por consiguiente vía de señalización

Debido a la importante relación que existe entre la insulina y la vía de fosforilación de Tau a través de la ruta IR-Akt-GSK, la señalización de la insulina en el SNC se ha convertido en el centro de atención del estudio de la patofisiología de la EA. Datos experimentales han demostrado la importancia de la insulina en el control de la fosforilación de Tau, y en la protección frente a la acumulación de A β (Zhao y Townsend, 2008). Según diversos estudios epidemiológicos existe una asociación entre la resistencia a la insulina con la consiguiente hiperinsulinemia y el deterioro cognitivo en ancianos (Stolk y col., 1997a y 1997b), y un mayor riesgo de desarrollar EA (Arvanitakis y col., 2004; Haan, 2006).

Entre los diferentes mecanismos que han sido sugeridos como posibles responsables de esta insulinoresistencia (Amatruda y col., 1985), nuestros resultados apuntan una vez más a JNK1, ya que esta enzima es capaz de fosforilar IRS1, inhibiendo de esta forma la señalización mediada por el receptor de insulina. Por otro lado, el aumento de la expresión de IDE podría conducir a la normalización de los niveles de insulina observada en los ratones tratados con propranolol. Por lo tanto el propranolol, bien actuando sobre pJNK o bien aumentando la expresión de IDE, podría estar modulando la activación de los receptores de insulina y sus vías asociadas.

4. Efectos del propranolol sobre la patología sináptica

A pesar de que no están claros los mecanismos patológicos que conducen al daño sináptico en la EA, además de la relación existente entre la aparición de ONFs y el daño neuronal (ver punto 1.2. de la Introducción), el A β parece jugar un papel clave. La acumulación del péptido A β intraneuronal parece ser uno de los principales responsables de la disfunción sináptica que se produce en la EA, y que se correlaciona con el déficit en

los fenómenos de aprendizaje y memoria que se observan en diferentes modelos animales de la EA.

Se ha descrito que el BDNF parece ser fundamental para la supervivencia continua y el mantenimiento del fenotipo de neurona madura, y se ha visto que es capaz de prevenir la muerte neuronal en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Barde, 1994; Siegel y Chauhan, 2000). Los niveles de BDNF disminuyen con la edad y son menores en cerebros de pacientes con EA que en aquellos que no presentan demencia. En varios modelos de ratones, ratas y primates la terapia con BDNF fue capaz de revertir tanto los daños sinápticos como los déficits en la memoria y el aprendizaje (Nagahara y col., 2009).

El BDNF del hipocampo es secretado a la matriz extracelular en forma de proBDNF que actuando a nivel de receptores p75NTR afecta negativamente a la supervivencia celular y la plasticidad sináptica. Sin embargo, este proBDNF es procesado para dar lugar principalmente BDNF maduro cuya señalización está mediada por su alta afinidad a receptores TrkB, y que finalmente actuará positivamente sobre la supervivencia y crecimiento celular y sobre la plasticidad sináptica y la memoria. Por lo tanto, el cociente proBDNF/mBDNF podría constituir una herramienta bastante precisa para determinar anticipadamente cuáles van a ser los efectos esperados del BDNF.

El otro marcador escogido fue la sinaptofisina. Esta proteína sináptica es fundamental para los procesos de memoria, aprendizaje y LTP, y se encuentra disminuida en cerebros de EA (Wakabayashi y col., 1994; Love y col., 2006). Varios autores sugieren que la sinaptofisina parece estar regulada parcialmente por el BDNF (Tartaglia y col., 2001; Valtorta y col., 2004), por lo que un cambio de la expresión de la sinaptofisina podría estar relacionados con cambios de la función del BDNF.

De acuerdo con otros estudios publicados, en los ratones SAMP8 se detectaron descensos en los niveles de sinaptofisina (Cheng y col., 2011) y BDNF (Tajes y col., 2010; Li y col., 2009) que podrían estar contribuyendo al déficit cognitivo. El tratamiento con propranolol fue capaz de revertir estos descensos. No ocurrió lo mismo en los ratones Tg2576, donde no se observaron diferencias significativas para estos marcadores sinápticos. Sin embargo, el propranolol produce un incremento tanto del BDNF como de la

sinaptofisina independientemente del genotipo, de manera que la mejora cognitiva observada en estos animales durante las pruebas conductuales podría verse favorecida, en parte, por estos aumentos.

Por último señalar que aunque atendiendo a la bibliografía existente, en un principio se podría esperar que el bloqueo de los β -receptores puede llevar a una disminución de los niveles de BDNF (Flores y col., 2010), nuestros resultados muestran en ambos casos un aumento significativo del ratio proBDNF/mBDNF correspondiente a los animales tratados, lo que sugiere que el propranolol podría modular el procesamiento de proBDNF a mBDNF.

5. Conclusión general

A la vista de todos estos resultados, se puede sugerir que el propranolol es capaz no solo de revertir los déficits cognitivos y el aumento de los niveles de A β asociados a la administración de corticosterona, al envejecimiento o a una sobreexpresión de APP, sino que también es capaz de revertir la patología de Tau en los 3 modelos. Es importante recordar que la dosis utilizada en todos los casos es inferior a la que se utiliza para el tratamiento de la hipertensión, por lo que todos estos efectos son independientes de la actividad antihipertensiva del propranolol.

Aunque no se ha podido esclarecer totalmente su posible mecanismo de acción, los datos obtenidos parecen señalar a una modulación de JNK que podría repercutir en la fosforilación de Tau mediante diferentes vías de señalización, así como a un aumento de IDE que favorecería el aclaramiento del péptido β -amiloide.

En conclusión, el propranolol parece estar ejerciendo un papel protector frente a la neuropatología de la enfermedad, lo que lo convierte en un potencial candidato para el tratamiento de la EA.

Bibliografía

Amatruda JM, Livingston JN, Lockwood DH. (1985). Cellular mechanisms in selected states of insulin resistance: human obesity, glucocorticoid excess, and chronic renal failure. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 1: 293-317.

Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA. (2004). Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Archives of Neurology* 61: 661-666.

Barde YA. (1994). Neurotrophic factors: an evolutionary perspective. *Journal of Neurobiology* 25: 1329-1333.

Bellucci A, Rosi MC, Grossi C, Fiorentini A, Luccarini I, Casamenti F. (2007). Abnormal processing of tau in the brain of aged TgCRND8 mice. *Neurobiology of Disease* 27: 328-338.

Bodendorf U, Danner S, Fischer F, Stefani M, Sturchler-Pierrat C., Wiederhold KH, Staufenbiel M, Paganetti P. (2002). Expression of human beta-secretase in the mouse brain increases the steady-state level of beta-amyloid. *Journal of Neurochemistry* 80: 799-806.

Bomboi G, Castello L, Cosenino F, Giubilei F, Orzi F, Volpe M. (2010). Alzheimer's disease and endothelial dysfunction. *Journal of the Neurological Sciences* 31: 1-8.

Briones A, Gagno S, Martisova E, Dobarro M, Aisa B, Solas M, Tordera R, Ramírez M. (2012). Stress-induced anhedonia is associated with an increase in Alzheimer's disease-related markers. *British Journal of Pharmacology* 165: 897-907.

Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallàs M. (2005). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mechanisms of Ageing and Development* 126: 1300-1304.

Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallàs M. (2005). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mechanisms of Ageing and Development* 126: 1300-1304.

Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature Neuroscience* 2: 271-276.

Cheng XR, Yang Y, Zhou WX, Zhang YX. (2011). Expression of VGLUTs contributes to degeneration and acquisition of learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 95: 361-375.

Cuadrado-Tejedor M, Hervias I, Ricobaraza A, Puerta E, Pérez-Roldán JM, García-Barroso C, Franco R, Aguirre N, García-Osta A. (2011). Sildenafil restores cognitive function without affecting A β burden in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiology of Aging* 164: 2029-2041.

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

El-faramawy YA, El-banouby MH, Sergeev P, Mortagy AK, Amer MS, Abdel-tawab AM. (2009). Changes in glutamate decarboxylase enzyme activity and tau-protein phosphorylation in the hippocampus of old rats exposed to chronic mild stress: reversal with the neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 91: 339-344.

Ewers M, Buerger K, Teipel SJ, Scheltens P, Schröder J, Zinkowski RP, Bouwman FH, Schönknecht P, Schoonenboom NS, Andreasen N, Wallin A, DeBernardis JF, Kerkman DJ, Heindl B, Blennow K, Hampel H. (2007). Multicenter assessment of CSF-phosphorylated Tau for the prediction of conversion of MCI. *Neurology* 69: 2205-2212.

Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 4162-4167.

Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B, Freixes M, Ribé E, Dalfó E, Avila J. (2005). Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Current Alzheimer Research* 2: 3-18.

Flores O, Núñez H, Pérez H, Morgan C, Soto-Moyano R, Valladares L, Burgos H, Olivares R, Hernández A. (2010). beta-Adrenoceptor blockade depresses molecular and functional plasticities in the rat neocortex. *Brain Research Bulletin* 82: 284-288.

García-Matas S, Gutierrez-Cuesta J, Coto-Montes A, Rubio-Acero R, Díez-Vives C, Camins A, Pallàs M, Sanfeliu C, Cristòfol R. (2008). Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Aging Cell* 7: 630-640.

Green KN, Billings LM, Roozendaal B, McGaugh JL, La Ferla FM. (2006). Glucocorticoids increase amyloid-beta and Tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 26: 9047-9056.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau (Tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 4913-4917.

Guo Z, Viitanen M, Winblad B, Fratiglioni L. (1999). Low blood pressure and incidence of dementia in a very old sample: dependent on initial cognition. *Journal of the American Geriatrics Society* 47: 723-726.

Haan MN. (2006). Therapy Insight: type 2 diabetes mellitus and the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Nature Clinical Practice Neurology* 2: 159-166.

Haas C. (2012). Strategies, Development, and Pitfalls of Therapeutic Options for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 28: 241-281.

Hanon O, Pequignot R, Seux ML, Lenoir H, Bune A, Rigaud AS, Forette F, Girerd X. (2006). Relationship between antihypertensive drug therapy and cognitive function in elderly hypertensive patients with memory complaints. *Journal of Hypertension* 24: 2101-2107.

Hanon O, Seux ML, Lenoir H, Latour F, Rigaud AS, Forette F. (2005). Cognitive functions and hypertension. *Archives des Maladies du Coeur Vaisseaux* 98: 133-139.

Hebert LE, Scherr PA, Bennett DA, Bienias JL, Wilson RS, Morris MC, Evans DA. (2004). Blood pressure and late-life cognitive function change: a biracial longitudinal population study. *Neurology* 62: 2021-2024.

Heim C, Nemeroff CB. (1999). The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biological Psychiatry* 46: 1509-1522.

in't Veld BA, Ruitenberg A, Hofman A, Stricker BH, Breteler MM. (2001). Antihypertensive drugs and incidence of dementia: the Rotterdam Study. *Neurobiology of Aging* 22: 407-412.

Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT. (1997). APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 56: 965-973.

Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, Martone R, Morrison JH, Pangalos MN, Reinhart PH, Bloom FE. (2006). Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 5161-5166.

Jeong YH, Park CH, Yoo J, Shin KY, Ahn SM, Kim HS, Lee SH, Emson PC, Suh YH. (2006). Chronic stress accelerates learning and memory impairments and increases amyloid deposition in APPV717I-CT100 transgenic mice, an Alzheimer's disease model. *FASEB Journal* 20: 729-731.

Karatsoreos IN, Bhagat SM, Bowles NP, Weil ZM, Pfaff DW, McEwen BS. (2010). Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse. *Endocrinology* 151: 2117-2127.

Kessler RC. (1997). The effects of stressful life events on depression. *Annual Review of Psychology* 48: 191-214.

Khachaturian AS, Zandi PP, Lyketsos CG, Hayden KM, Skoog I, Norton MC, Tschanz JT, Mayer LS, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC. (2006). Antihypertensive medication use and incident Alzheimer disease: the Cache County Study. *Archives of Neurology* 63: 686-692.

Kimura T, Yamashita S, Fukuda T, Park JM, Murayama M, Mizoroki T, Yoshiike Y, Sahara N, Takashima A. (2007). Hyperphosphorylated TAU in parahippocampal cortex impairs place learning in aged mice expressing wild-type human TAU. *The EMBO Journal* 26: 5143-5152.

Kivipelto M, Helkala EL, Hänninen T, Laakso MP, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. (2001). Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study. *Neurology* 56: 1683-1689.

Knopman DS. (2009). Hypertension and late-life dementia. A real link? *Neurology* 72: 1716-1717.

Kögel D, Schomburg R, Copanaki E, Prehn JH. (2005). Regulation of gene expression by the amyloid precursor protein: inhibition of the JNK/c-Jun pathway. *Cell Death Differentiation* 12: 1-9.

Korneyev AY. (1998) Stress-induced tau phosphorylation in mouse strains with different brain Erk 1 + 2 immunoreactivity. *Neurochemical research* 23: 1539-1543.

Kurochkin IV, Goto S. (1994). Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Letters* 345: 33-37.

Lawes CMM, Vander Hoorn S, Law MR, Elliott P, MacMahon S, Rodgers A. (2000). Blood pressure and the global burden of disease 2000. Part 1: estimates of blood pressure levels. *Journal of Hypertension* 24: 413-422.

Lee BC, Mintun M, Buckner RL, Morris JC. (2003). Imaging of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimaging* 13: 199-214.

Li Q, Zhao HF, Zhang ZF, Liu ZG, Pei XR, Wang JB, Li Y. (2009). Long-term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing Abeta1-42 oligomers and upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus. *Neuroscience* 163: 741-749.

Liu W, Liu C, Zhu J, Shu P, Yin B, Gong Y, Qiang B, Yuan J, Peng X. (2010). MicroRNA-16 targets amyloid precursor protein to potentially modulate Alzheimer's-associated pathogenesis in SAMP8 mice. *Neurobiology of Aging* 33: 522-534.

Love S, Siew LK, Dawbarn D, Wilcock GK, Ben-Shlomo Y, Allen SJ. (2006). Premorbid effects of APOE on synaptic proteins in human temporal neocortex. *Neurobiology of Aging* 27: 797-803.

Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R. (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nature Neuroscience* 4: 231-232.

Maruyama J, Naguro I, Takeda K, Ichijo H. (2009). Stress-activated MAP kinase cascades in cellular senescence. *Current Medicinal Chemistry* 16: 1229-1235.

McDermott JR, Gibson AM. (1997). Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochemical Research* 22: 49-56.

McEwen BS. (2002). Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiology of Aging* 23: 921-939.

Miller DB, O'Callaghan JP. (2005). Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Research Reviews* 4: 123-140.

Morley JE, Kumar VB, Bernardo AE, Farr SA, Uezu K, Tumosa N, Flood JF. (2000). Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides* 21: 1761-1767.

Mouri A, Noda Y, Hara H, Mizoguchi H, Tabira T, Nabeshima T. (2007). Oral vaccination with a viral vector containing Abeta cDNA attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model. *FASEB Journal* 163: 2135-2148.

Murray MD, Lane KA, Gao S, Evans RM, Unverzagt FW, Hall KS, Hendrie H. (2002). Preservation of cognitive function with antihypertensive medications: a longitudinal analysis of a community-based sample of African Americans. *Archives of Internal Medicine* 162: 2090-2096.

Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski M.H. (2009). Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 15: 331-337.

Orejana L, Barros-Miñones L, Jordán J, Puerta E, Aguirre N. (2011). Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model. *Neurobiology of Aging* 33: 625.e11-20.

Ott C, Concha II, Arendt T, Stieler J, Schliebs R, González-Billault C, Maccioni RB. (2002). AbetaPP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576. *Journal of Alzheimer's Disease* 4: 417-430.

Pallas M, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesus G. (2008). From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *Journal of Alzheimer's Disease* 15: 615-624.

Pang KCH, Miller JP, Fortress A, McAuley D. (2006). Age-related disruptions of circadian rhythm and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM8). *Age* 28: 283-296.

Peila R, White LR, Masaki K, Petrovitch H, Launer LJ. (2006). Reducing the risk of dementia: efficacy of long-term treatment of hypertension. *Stroke* 37: 1165-1170.

Perez-Cruz C, Nolte MW, van Gaalen MM, Rustay NR, Termont A, Tanghe A, Kirchhoff F, Ebert U. (2011). Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 31: 3926-3934.

Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *Journal of Biological Chemistry* 273: 32730-32738.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal* 22, 659-661.

Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko HJ, Barrett T, Kim JK, Davis RJ. (2008). A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322: 1539-1543.

Sasaki A, Shoji M, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Ikeda M, Naito M, Matsubara E, Abe K, Nakazato Y. (2002). Amyloid cored plaques in Tg2576 transgenic mice are characterized by giant plaques, slightly activated microglia, and the lack of paired helical filament-typed, dystrophic neurites. *Virchows Archiv* 441: 358-367.

Schneider A, Biernat J, von Bergen M, Mandelkow E, Mandelkow EM. (1999). Phosphorylation that detaches TAU protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 38: 3549-3558.

Seux ML, Thijs L, Forette F, Staessen JA, Birkenhäger WH, Bulpitt CJ, Girerd X, Jääskivi M, Vanhanen H, Kivinen P, Yodfat Y, Vänskä O, Antikainen R, Laks T, Webster JR, Hakamäki T, Lehtomäki E, Lilov E, Grigorov M, Janculova K, Halonen K, Kohonen-Jalonen P, Kermowa R, Nachev C, Tuomilehto J. (1998). Correlates of cognitive status of old patients with isolated systolic hypertension: the Syst-Eur Vascular Dementia Project. *Journal of Hypertension* 16: 963-969.

Siegel GJ, Chauhan NB. (2000). Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Research Reviews* 33: 199-227.

Solas M, Aisa B, Mugueta MC, Del Río J, Tordera RM, Ramírez MJ. (2010). Interactions between age, stress and insulin on cognition: implications for Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacology* 35: 1664-1673.

Starr JM, Whalley LJ, Inch S, Shering PA. (1993). Blood pressure and cognitive function in healthy old people. *Journal of the American Geriatrics Society* 41: 753-756.

Stolk RP, Breteler MM, Ott A, Pols HA, Lamberts SW, Grobbee DE, Hofman A. (1997a). Insulin and cognitive function in an elderly population. The Rotterdam Study. *Diabetes Care* 20: 792-795.

Stolk RP, Pols HA, Lamberts SW, de Jong PT, Hofman A, Grobbee DE. (1997b). Diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, and hyperinsulinemia in an elderly population. The Rotterdam Study. *American Journal of Epidemiology* 145: 24-32.

Sureda FX, Gutierrez-Cuesta J, Romeu M, Mulero M, Canudas AM, Camins A, Mallol J, Pallàs M. (2006). Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Experimental Gerontology* 41: 360-367.

Tagliatela G, Hogan D, Zhang WR, Dineley KT. (2009). Intermediate- and long-term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition. *Behavioural Brain Research* 200: 95-99.

Tajes M, Gutierrez-Cuesta J, Folch J, Ortuño-Sahagun D, Verdaguer E, Jiménez A, Junyent F, Lau A, Camins A, Pallàs M. (2010). Neuroprotective role of intermittent fasting in senescence-accelerated mice P8 (SAMP8). *Experimental Gerontology* 45: 702-710.

Tamagno E, Guglielmotto M, Giliberto L, Vitali A, Borghi R, Autelli R, Danni O, Tabaton M. (2009). JNK and ERK1/2 pathways have a dual opposite effect on the expression of BACE1. *Neurobiology of Aging* 30: 1563-1573.

Tamagno E, Parola M, Bardini P, Piccini A, Borghi R, Guglielmotto M, Santoro G, Davit A, Danni O, Smith MA, Perry G, Tabaton M. (2005). Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *Journal of Neurochemistry* 92: 628-636.

Tartaglia N, Du J, Tyler WJ, Neale E, Pozzo-Miller L, Lu B. (2001). Protein synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Biological Chemistry* 276: 37585-37593.

Tomidokoro Y, Ishiguro K, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Park JM, Yasutake K, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M. (2001). Abeta amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP(Sw) mice. *Neuroscience Letters* 299: 169-172.

Tomobe K, Nomura Y. (2009). Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence. *Neurochemical Research* 34: 660-669.

Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. (2004). Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *BioEssays* 26: 445-453.

van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP. (2006). Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Progress in Neurobiology* 79: 205-221.

van der Vlies AE, Verwey NA, Bouwman FH, Blankenstein MA, Klein M, Scheltens P, van der Flier WM. (2009). CSF biomarkers in relationship to cognitive profiles in Alzheimer disease. *Neurology* 72: 1056-1061.

Vekrellis K, Ye Z, Qiu WQ, Walsh D, Hartley D, Chesneau V, Rosner MR, Selkoe DJ. (2000). Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *Journal of Neuroscience* 20: 1657-1665.

Wakabayashi K, Honer WG, Masliah E. (1994). Synapse alterations in the hippocampal-entorhinal formation in Alzheimer's disease with and without Lewy body disease. *Brain Research* 667: 24-32.

Wang J, Ho L, Chen L, Zhao Z, Zhao W, Qian X, Humala N, Seror I, Bartholomew S, Rosendorff C, Pasinetti GM. (2007). Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Clinical Investigation* 117: 3393-3402.

Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH. (2002). The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 22: 1858-1867.

Zhao WQ, Townsend M. (2008). Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1792: 482-496.

Ziegler-Graham K, Brookmeyer R, Johnson E, Arrighi HM. (2008). Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer's disease incidence rates. *Alzheimer's & Dementia* 4: 316-323.

Capítulo VII

Capítulo 7

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten deducir las siguientes conclusiones:

1. Se han encontrado alteraciones cognitivas en la prueba de reconocimiento del nuevo objeto en los tres modelos experimentales de EA utilizados. En los ratones transgénicos Tg2576 los trastornos de memoria se observaron también en la prueba del miedo condicionado. En todos los casos, el tratamiento crónico con propranolol (5 mg/kg, i.p.) fue capaz de contrarrestar estos déficits cognitivos.

2. El tratamiento farmacológico con propranolol fue capaz de disminuir el incremento de los niveles de A β observados en todos los modelos animales en el hipocampo, efecto asociado posiblemente a un aumento de su aclaramiento debido al aumento de la expresión de la enzima degradadora de insulina (IDE). En los ratones SAMP8 se observó además un aumento de la expresión de la enzima BACE1, lo que sugiere un aumento en el procesamiento amiloidogénico, que fue revertido por el propranolol.

3. En todos los modelos experimentales se observó aumento de la proteína Tau fosforilada en el hipocampo. Descensos de la expresión de pAkt y pGSK-3 β (forma inactiva) fueron encontrados también, lo que pudiera contribuir al aumento en la fosforilación de Tau. El tratamiento con propranolol revierte todos estos efectos.

4. La expresión de pJNK1 está aumentada en los tres modelos experimentales utilizados, lo que pudiera asociarse al aumento en la fosforilación de Tau. Propranolol de nuevo fue capaz de revertir las alteraciones en los niveles de pJNK1. Además, dado que pJNK1 podría estar regulando al alza los niveles de BACE1, la modulación de pJNK1 por parte del propranolol en el modelo de envejecimiento SAMP8 podría explicar los efectos encontrados tanto sobre la patología amiloide como la sobre la patología Tau.

5. La administración crónica de corticosterona indujo en los ratones cambios indicativos de una situación de resistencia a insulina, como son un aumento en los niveles de insulina periférica y una disminución en la expresión del receptor de insulina y de las vías intracelulares asociadas (disminución de pAkt) en el hipocampo. El propranolol fue capaz de revertir esta situación de resistencia a insulina, bien por sus efectos sobre pJNK1 o bien por el aumento en la expresión de IDE.

6. Tanto en el modelo de envejecimiento (ratones SAMP8) como en el modelo transgénico Tg2576 se observaron descensos en los niveles de sinaptofisina y del cociente proBDNF/BDNF, lo que sugiere que en estos modelos hay alteraciones en la plasticidad sináptica. Propranolol fue capaz de revertir todos estos efectos.

7. La dosis de propranolol utilizada en todos los casos es inferior a la que se utiliza para el tratamiento de la hipertensión, por lo que los efectos obtenidos parecen ser independientes de la actividad antihipertensiva de este fármaco.

8. En resumen, el tratamiento crónico con propranolol fue capaz de revertir los efectos sobre la patología amiloide, Tau y sináptica producidos por el envejecimiento, la sobreexpresión de APP mutada ó la elevación de los glucocorticoides. Todos estos efectos podría contribuir a la mejora cognitiva por el tratamiento con propranolol encontrada en los tres modelos experimentales. El presente trabajo apoya la idea de que el propranolol podría constituir un potencial candidato para el tratamiento de la EA.

