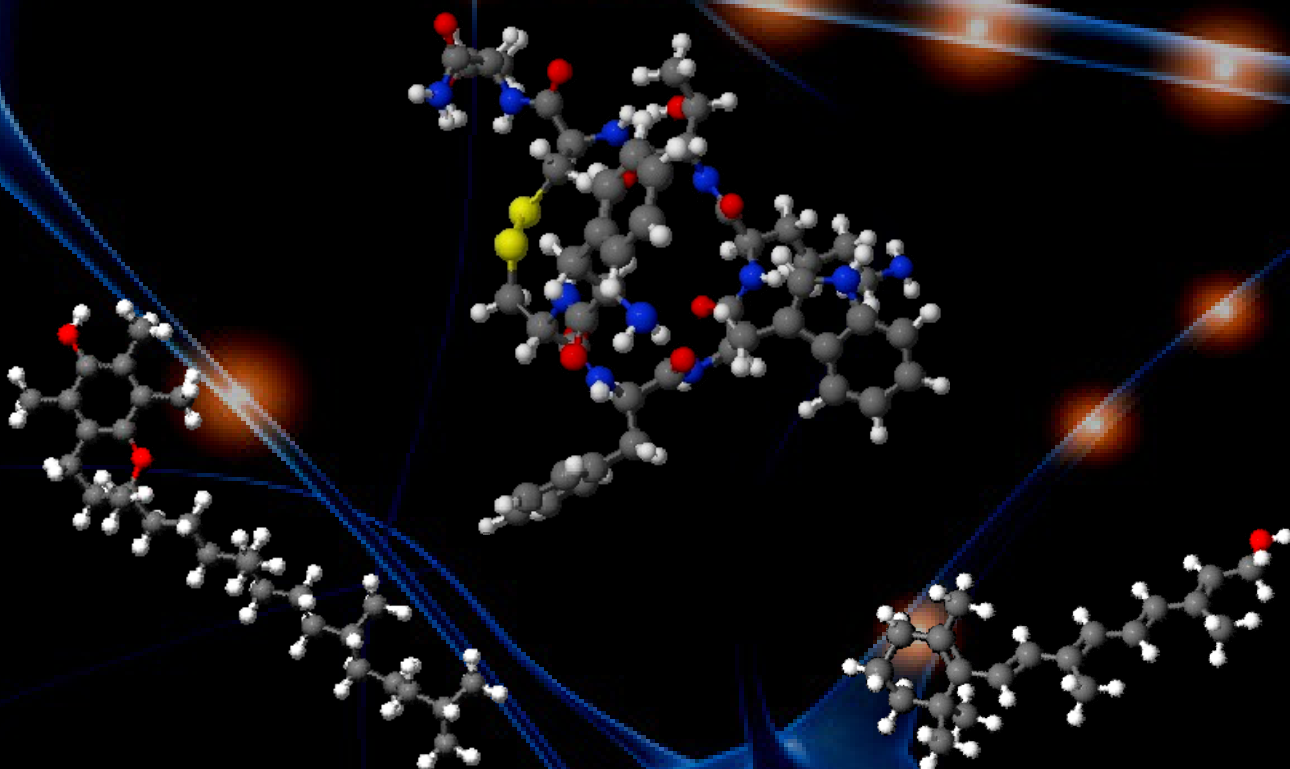


UNIVERSIDAD DE ALCALÁ  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



Tesis Doctoral

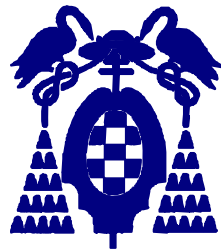
CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE LAS  
VITAMINAS A y E SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN  
SOMATOSTATINÉRGICA EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA



Alberto Miguel Hernández Pinto

2009

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



Tesis Doctoral

**CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE LAS  
VITAMINAS A y E SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN  
SOMATOSTATINÉRGICA EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA**

Alberto Miguel Hernández Pinto

2009

Imagen de portada modificada de: <http://www.faqs.org/photo-dict/photofiles/original/667/1077neuron.jpg>  
Imagen del hígado modificada de: <http://sotoanatomiaabdomen.files.wordpress.com/2007/06/higado-33.jpg>  
Figura 3 obtenida de: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/vitamins/vitaminaa.html>  
Figura 13 modificada de: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gray739-emphasizing-hippocampus.png>  
Figura 29 modificada de la Tesis Doctoral de la Dra. Rosa María Izquierdo Claros (2000) y modificada de:  
[http://thebrain.mcgill.ca/flash/a/a\\_07/a\\_07\\_cl/a\\_07\\_cl\\_tra/a\\_07\\_cl\\_tra.html](http://thebrain.mcgill.ca/flash/a/a_07/a_07_cl/a_07_cl_tra/a_07_cl_tra.html)  
Las imágenes 3D de las moléculas han sido posibles gracias al programa Jmol  
(<http://jmol.sourceforge.net/index.es.html>)



Al empezar esta página comprendo que una etapa de mi vida llega a su fin. Desde pequeño soñé con poder dedicarme a la investigación y ese sueño toma hoy forma física en forma de Tesis Doctoral. Han sido muchos años de esfuerzo, pequeños triunfos y grandes batacazos que me han permitido madurar y llegar a ser lo que hoy soy, como científico y como persona, para bien o para mal. A lo largo de este tiempo he conocido a mucha gente con la que he compartido un tramo más o menos largo de este camino y a las que hoy quiero tener presentes. Por eso mismo, este trabajo no es mérito sólo mío, sino de un equipo de gente que, con su apoyo y su tiempo, han hecho posible que llegue el día de hoy. Sé que lo académicamente correcto en estos casos es comenzar agradeciendo a los directores la dedicación y confianza depositadas en uno, pero me van ustedes a permitir que me tome la pequeña licencia de comenzar agradeciendo esta Tesis a mis padres, José Pedro y Pilar, porque sin su apoyo, sin su paciencia y sin su comprensión a lo largo de todos estos años, no habría podido llegar hasta el final.

Ahora sí, una vez dicho esto, retomo lo académicamente correcto y dirijo estas merecidas palabras de agradecimiento a mis directores, Eduardo y Lilian. Ambos han sido un ejemplo de trabajo, sabiduría y dedicación a la ciencia y a la docencia. A ellos les debo este trabajo y les agradezco de corazón la confianza que depositaron en mí cuando me abrieron de par en par las puertas del laboratorio. A lo largo de todo este tiempo han sido mis mentores y me han dedicado su tiempo, han sabido animarme y criticarme, constructivamente siempre, para que mi paso por el laboratorio diera sus frutos. Sin ellos esto tampoco hubiera sido posible. Gracias a los dos.

La siguiente persona a la que quiero dedicar unas palabras es David, compañero de laboratorio y, muy por encima de eso, gran amigo. A él debo una buena parte de este trabajo. Gracias por estar siempre ahí, por tu siempre presente apoyo, por enseñarme, por los momentos inolvidables vividos tanto en la Universidad como fuera de ella, por las risas y lágrimas compartidas en todos estos años, por tu apoyo y tu sinceridad.

A Emma, compañera de Laboratorio y amiga. Gracias por haber estado ahí, por enseñarme, por darme ánimos cuando los necesité y por los buenos momentos vividos en torno a una gradilla.

A Macarena, también compañera y amiga. Aunque el tiempo nos ha distanciado guardo con cariño cada momento, risa y lágrima que he compartido contigo, dentro y fuera de este Lab. 7.



A Arancha (lo siento, pero escribir “tx” en lugar de “ch” me causa urticaria). Gracias por tantos y tantos momentos inolvidables a tu lado, por estar siempre dispuesta a ayudar, por los ratos de “cultivos”, por tu confianza, por tu forma de ser, y sí, también por tus interminables interrogatorios que, aunque desesperantes, me sirvieron también para reflexionar y aprender.

A María, aunque tu paso por el laboratorio fue breve siempre estuviste dispuesta a ayudar y echar una mano cuando lo necesitaba. Gracias por todo ello.

A todas esas personas que, en mayor o menor grado, han pasado por el laboratorio para aprender, que siempre han estado dispuestas a ayudar y con las que he compartido mi tiempo: Fidel, Gonzalo, Mar, Laura, Lucía, Maritere, Ana, Leticia, Mampi...

No puedo olvidar tampoco a aquellas personas de otros laboratorios con las que he vivido momentos maravillosos y únicos. Empiezo este bloque de agradecimientos por las chicas del “Lab 3”: Anita, María, Lidia, Nuria, Diana y Sophie. Personas únicas cuya relación conmigo ha trascendido en la mayoría de los casos el ámbito profesional y a las que hace tiempo que dejé de llamar compañeras para llamar amigas. Gracias por todos los momentos, buenos y no tan buenos, que he vivido con vosotras. Por cada sonrisa, abrazo, pincho, lágrima, puya y chanza intercambiada. Por ser como sois: geniales.

A los chicos y chicas de enfrente y del fondo del pasillo: Óscar, César, Eva, Borja, Vero, Sandra, Ana Bajo, Anuska, Valdehíta, Sandra, la otra Sandra, Luisote, Eva y Adriana. A algunos de vosotros os he podido conocer más y a otros menos, con muchos he vivido congresos y con la mayoría he compartido comidas, sobremesas y risas. De todos y cada uno de vosotros me llevo un grandísimo recuerdo imborrable. Todos vosotros habéis ayudado a hacer de este sitio un lugar mucho más agradable donde trabajar y pasar estos años. También quiero mandar un abrazo particular a Javi y a Mali, por su tiempo, por su dedicación y por su ayuda.

Al resto de los becarios del departamento. Sois demasiados y yo tengo muy mala memoria con los nombres como para citaros a todos, así que antes de quedar mal con alguien, desde aquí os envío un abrazo general. Todos habéis puesto vuestro granito de arena para ayudarme a llegar hasta hoy.

A Luisito. No tengo palabras para agradecerte el hecho de ser como eres, tu ayuda, tu apoyo. Lo resumiré diciendo que tu amistad es uno de los mejores recuerdos que me llevo de estos años.

Al resto del profesorado; a Miguel y a Angélica. Por vuestra simpatía y compañía, por vuestra profesionalidad y educación, siempre dispuestos a echar un cable, a resolver dudas, a ayudar. En especial a Miguel Ángel Lasunción, Menchu, Inés, Miguel Ángel Pérez, Ángel Herráez y Luis, por vuestros consejos e ideas.

A Juan y a Guillermo. Han sido muchas horas trabajando bajo vuestro techo, gracias por la paciencia, por vuestra comprensión, por la cercanía y, por qué no decirlo, por los cafés, las risas y los vaciles. Sois un ejemplo de profesionalidad.

A José María, Ángel, Mariano, Montse y el resto del personal del CEA. Gracias por haberme enseñado, por el tiempo invertido, por las dudas resueltas, por vuestra ayuda.

A Isabel y al resto del personal de la Unidad de Cultivos. Aunque he trabajado poco con vosotras también me habéis ayudado, enseñado y aconsejado. Gracias también a vosotras.

Gracias también a Marta, a Soraya y al resto del Departamento de Especialidades Médicas, por ayudarme con las tinciones histológicas.

A las ratas que, voluntaria o involuntariamente, dieron su vida por este trabajo y lo hicieron posible.

A Eugenio, Manolo, Albertito, Gema, Estela, Lilly y al resto de los camareros de la cafetería. Sin vuestros cafés, refrescos y cervezas estos años no hubiera sido tan agradables.

A toda mi pequeña gran familia, abuelos, tíos, primos y ahijado; siempre animándome y apoyándome hasta el final. Gracias a todos vosotros.

A la Sefa, a toda su gente y a José Ramón Nogueroles en especial, quien un día hace ya muchos años despertó en mí la pasión por la Biología.

A mis amigos, Alberto y Tere, Jaime, Javi, Dani y Laura, Alberto y Ramón; compañeros de fatigas y sabios entre los sabios. Son muchos años ya compartiendo penas y alegrías, clases, anécdotas, duelos a gomaespumazos, convivencias y *frikideces* varias. Siempre os he tenido cerca cuando os he necesitado y una gran parte de este trabajo os la debo a vosotros. A los Locos hacia Nínive. Por todo lo que representan en mi vida, por ser todos y cada uno de ellos únicos y especiales. Por todo vuestro apoyo, por vuestro ánimos, dinámicas y Locuras.

A Arnethion, Fantasy, Buscadores, Piratas, Salva y Antonio. Vosotros representáis esa válvula de escape tan necesaria en los momentos difíciles. Cada pedazo de corcho blanco pintado de plateado, brazalete cosido y relé soldado me han servido para dejar de lado mis problemas y seguir caminando. Gracias a todos.

A Anita G. por quien, pese a su deserción de la Biología, siento un cariño muy especial. Por cada Pascua, risa, abrazo, llanto, canción y agobio compartido. Por las interminables conversaciones y monólogos en el Messenger que nos llevaron a conocernos.

A Álex, siempre dispuesta a escuchar y a ser escuchada; a apoyar en los momentos difíciles y a ayudarme a seguir adelante. Gracias.

A Odie, quien pese a no comprender muy bien a qué me dedicaba cuando no estaba en casa, siempre estuvo dispuesto a hacerme compañía.

A Irene, por todo este tiempo a mi lado, por prestarme tu hombro para desahogarme, por tu ayuda, por tus ánimos hasta el final y por tus collejas. Por, desde la cercanía y desde la distancia, haberme escuchado y apoyado en los momentos fáciles y difíciles. Este trabajo también es tuyo.

...Y por último, a usted, o a ti, si es que me permites tutearte. Sí, sí, tú, el que está leyendo estas últimas líneas extrañado. Ya sea por que pertenece al Tribunal encargado de evaluar esta Tesis, en cuyo caso le trataré de usted; o bien porque has sentido curiosidad al leer el título, o necesitas consultar la sección de materiales y métodos o cualesquiera que sean tus motivos para haber abierto este libro, gracias por haberte interesado por mi trabajo.

## Índice

“Casi todos los aspectos de la vida están diseñados a nivel molecular y, sin comprender las moléculas, sólo podemos tener una comprensión muy general de la vida”.

[Francis H. C. Crick]

**ÍNDICE**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. LAS VITAMINAS</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Definición</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Descubrimiento de las vitaminas</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Clasificación de las vitaminas</b>	<b>5</b>
<b>1.3.1. Vitaminas liposolubles</b>	<b>6</b>
<b>1.3.2. Vitaminas hidrosolubles</b>	<b>6</b>
<b>1.3.3. Falsas vitaminas</b>	<b>7</b>
<b>1.4. La vitamina A</b>	<b>7</b>
<b>1.4.1. Descubrimiento de la vitamina A</b>	<b>7</b>
<b>1.4.2. Estructura de la vitamina A</b>	<b>8</b>
<b>1.4.3. Necesidades diarias de vitamina A</b>	<b>10</b>
<b>1.4.4. Metabolismo de la vitamina A</b>	<b>11</b>
1.4.4.1. Absorción	11
1.4.4.2. Almacenamiento	12
1.4.4.3. Transporte sanguíneo	12
1.4.4.4. Incorporación de vitamina A a los tejidos diana	14
<b>1.4.5. Mecanismo de acción de la vitamina A</b>	<b>15</b>
1.4.5.1. Receptores de ácido retinoico	15
1.4.5.1.1. Elementos de respuesta a retinoides	19
1.4.5.2. Vía citosólica de acción	21
<b>1.4.6. Funciones de la vitamina A en el organismo</b>	<b>21</b>
1.4.6.1. Papel de la vitamina A en la visión	21
1.4.6.2. Papel de la vitamina A en la reproducción	22
1.4.6.3. Papel de la vitamina A en el crecimiento y desarrollo	23
1.4.6.4. Papel de la vitamina A en la respuesta inmune	24
1.4.6.5. Papel de la vitamina A sobre las células epiteliales	24
1.4.6.6. Papel de la vitamina A en el sistema nervioso central	25
1.4.6.6.1. Implicación de la vitamina A en el aprendizaje y la memoria	26
1.4.6.6.2. Implicación de la vitamina A en la plasticidad sináptica	27
1.4.6.6.3. Implicación de la vitamina A en la neurogénesis	28
<b>1.5. La vitamina E</b>	<b>29</b>
<b>1.5.1. Descubrimiento de la vitamina E</b>	<b>29</b>
<b>1.5.2. Estructura de la vitamina E</b>	<b>30</b>
<b>1.5.3. Necesidades diarias de vitamina E</b>	<b>32</b>
<b>1.5.4. Metabolismo de la vitamina E</b>	<b>32</b>
1.5.4.1. Absorción	32
1.5.4.2. Transporte y almacenamiento	33
1.5.4.3. Transporte e incorporación de la vitamina E a los tejidos diana	34
<b>1.5.5. Mecanismo de acción de la vitamina E</b>	<b>37</b>
1.5.5.1. Acciones antioxidantes de la vitamina E	38



1.5.5.2. Modulación de la transducción de señales por la vitamina E	41
<b>1.5.6. Funciones de la vitamina E en el organismo</b>	<b>43</b>
1.5.6.1. Papel de la vitamina E en el sistema inmunitario	43
1.5.6.2. Papel de la vitamina E en la reproducción	44
1.5.6.3. Papel de la vitamina E en el sistema nervioso central	45
1.5.6.3.1. La vitamina E como molécula neuroprotectora	47
<b>2. EL ESTRÉS OXIDATIVO</b>	<b>50</b>
<b>2.1. Los radicales libres</b>	<b>50</b>
2.1.1. Los radicales libres en el organismo	51
<b>2.2. Las defensas antioxidantes</b>	<b>54</b>
<b>2.3. El estrés oxidativo en el sistema nervioso central</b>	<b>56</b>
<b>3. EL HIPOCAMPO</b>	<b>59</b>
<b>3.1. Anatomía del hipocampo</b>	<b>59</b>
<b>3.2. Base funcional</b>	<b>61</b>
3.2.1. Circuitos neuronales en el hipocampo	62
<b>3.3. Bases neurológicas del aprendizaje y la memoria</b>	<b>62</b>
<b>3.3.1. Procesos de plasticidad sináptica a corto plazo</b>	<b>64</b>
3.3.1.1. Facilitación	64
3.3.1.2. Potenciación post-tetánica	64
3.3.1.3. Depresión sináptica	65
<b>3.3.2. Procesos de plasticidad sináptica a largo plazo</b>	<b>66</b>
3.3.2.1. Potenciones a largo plazo	66
3.3.2.2. Depresiones a largo plazo	68
<b>4. EL SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO</b>	<b>71</b>
<b>4.1. Descubrimiento de la somatostatina</b>	<b>71</b>
<b>4.2. Estructura de la somatostatina</b>	<b>72</b>
<b>4.3. Biosíntesis de la somatostatina</b>	<b>73</b>
4.3.1. Estructura y regulación del gen de la somatostatina	73
4.3.2. Biosíntesis de la somatostatina	75
4.3.3. Distribución de la somatostatina en el organismo	78
4.3.4. Distribución de la somatostatina en el sistema nervioso central	79
<b>4.4. Acciones fisiológicas de la somatostatina</b>	<b>80</b>
4.4.1. Acciones fisiológicas en tejidos periféricos	80
4.4.2. Acciones fisiológicas en el sistema nervioso central	81
<b>4.5. Mecanismo de acción de la somatostatina</b>	<b>82</b>
4.5.1. Características estructurales y farmacológicas de los receptores de somatostatina	82
4.5.2. Estructura de los genes de los receptores de somatostatina	85
4.5.3. Regulación de los receptores de somatostatina	87
4.5.3.1. Regulación dependiente de agonista	87
4.5.3.2. Homo- y Heterodimerización de los receptores de somatostatina	90



4.5.3.3. Regulación de la expresión de los receptores de somatostatina	91
<b>4.5.4. Distribución de los receptores de somatostatina</b>	<b>92</b>
4.5.4.1. Distribución en el Sistema Nervioso Central	92
4.5.4.2. Distribución en los tejidos periféricos	93
<b>4.6. Sistemas de transducción de señales acoplados a los receptores de somatostatina</b>	<b>95</b>
4.6.1. Proteínas G	95
4.6.2. Adenilato ciclasa	99
4.6.3. Canales de potasio	102
4.6.4. Canales de calcio	103
4.6.5. Vesículas de secreción	103
4.6.6. Bomba $\text{Na}^+/\text{H}^+$	104
4.6.7. Fosfotirosina fosfatasas	104
4.6.8. Fosfolipasas	109
<b><u>OBJETIVOS</u></b>	<b><u>113</u></b>
<b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	<b><u>119</u></b>
1. REACTIVOS	121
2. ANIMALES Y MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN	126
2.1. Animales de experimentación	126
2.2. Modelo de deficiencia de vitamina A	126
2.2.1. Tratamiento con vitamina A	126
2.3. Modelo de deficiencia de vitamina E	126
2.3.1. Tratamiento con vitamina E	126
3. EXTRACCIÓN DEL ENCÉFALO Y DISECCIÓN DEL HIPOCAMPO	127
3.1. Extracción del encéfalo	127
3.2. Disección del cerebro	127
4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	129
4.1. Obtención de membranas celulares y citosoles	129
4.1.1. Reactivos	129
4.1.2. Método	129
4.2. Obtención de la fracción soluble	130
4.2.1. Reactivos	130
4.2.2. Método	130
4.3. Obtención de plasma	130
5. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE RETINOL Y TOCOFEROL EN PLASMA, HÍGADO E HIPOCAMPO	131
5.1. Preparación de las muestras	131
5.1.1. Reactivos	131
5.1.2. Método	131



5.1.2.1.Extracción de todo- <i>trans</i> -retinol y $\alpha$ -tocoferol de hígado e hipocampo	131
5.1.2.2.Extracción de todo- <i>trans</i> -retinol y $\alpha$ -tocoferol en plasma	132
<b>5.2. Determinación de los niveles de todo-<i>trans</i>-retinol</b>	<b>132</b>
<b>5.3. Determinación de los niveles de <math>\alpha</math>-tocoferol</b>	<b>133</b>
<b>6. MARCAJE DE TYR<sup>11</sup>-SOMATOSTATINA-14 CON Na<sup>125</sup>I</b>	<b>134</b>
6.1. Reactivos	134
6.2. Preparación de la columna	135
6.3. Marcaje	135
6.4. Purificación	136
6.5. Test de adsorción al talco	136
<b>7. DETERMINACIÓN DE LA SOMATOSTATINA TISULAR</b>	<b>137</b>
7.1. Extracción de la somatostatina tisular	137
7.2. Determinación de la concentración de somatostatina tisular	137
7.2.1. Reactivos	137
7.2.2. Método	137
<b>8. UNIÓN DE LA SOMATOSTATINA A SUS RECEPTORES ESPECÍFICOS EN MEMBRANAS DE HIPOCAMPO</b>	<b>138</b>
8.1. Reactivos	138
8.2. Método	139
<b>9. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS</b>	<b>140</b>
9.1. Reactivos	140
9.2. Método	140
9.2.1. Preparación de los geles	140
9.2.2.Preparación de las muestras	141
9.2.3.Electroforesis y transferencia	141
9.3.Inmunodetección	141
<b>10. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA</b>	<b>142</b>
10.1. Reactivos	143
10.2. Método	146
<b>11. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOSFOTIROSINA FOSFATASA</b>	<b>147</b>
11.1. Preparación de membranas de células A-431	148
11.1.1. Reactivos	148
11.1.2. Método	148
11.2. Marcaje del Poli-(Glu:Tyr) con <sup>33</sup> P	148
11.2.1. Reactivos	148
11.2.2. Método	149
11.3. Valoración de la actividad fosfotirosina fosfatasa	150
11.3.1. Reactivos	150
11.3.2. Método para valorar la actividad PTP basal	150
11.3.3. Método para valorar la actividad PTP estimulada por somatostatina	151





<b>12. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ARNm</b>	<b>152</b>
12.1. Extracción de ARN total	152
12.1.1. Reactivos	152
12.1.2. Método	152
12.2. Purificación de ARN total con ADNasa I	152
12.2.1. Reactivos	153
12.2.2. Digestión de ADNasa I	153
12.2.3. Purificación con fenol	153
12.3. Comprobación de la integridad del ARN	154
12.3.1. Reactivos	154
12.3.2. Método	154
12.4. Aislamiento del ARNm a partir del ARN total	155
12.4.1. Contenido del kit	155
12.4.2. Método	156
<b>13. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA</b>	<b>156</b>
13.1. Reacción de retrotranscripción	156
13.1.1. Reactivos	156
13.1.2. Método	157
13.2. Análisis de la expresión del gen de la somatostatina	157
13.2.1. PCR	157
13.2.1.1. Reactivos	157
13.2.1.2. Método	158
13.2.2. Southern Blot	158
13.2.2.1. Reactivos	158
13.2.2.2. Electroforesis y transferencia	159
13.2.2.3. Hibridación	159
13.3. Análisis de la expresión génica mediante pcr a tiempo real	160
13.3.1. Reactivos	162
13.3.2. Método	162
<b>14. MEDIDA DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS</b>	<b>163</b>
14.1. Reactivos	163
14.2. Método	163
<b>15. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATION</b>	<b>164</b>
15.1. Reactivos	164
15.2. Método	165
15.2.1. Extracción del glutation	165
15.2.2. Determinación de los niveles de glutation total (GSx)	165
15.2.3. Determinación de los niveles de glutation oxidado (GSSG)	166
<b>16. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA (CAT)</b>	<b>166</b>
16.1. Reactivos	166
16.2. Método	166
<b>17. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA</b>	<b>167</b>
17.1. Reactivos	167



17.2. Método	168
17.2.1. Extracción de la enzima	168
17.2.2. Medida de la actividad SOD	168
18. TINCIÓN IN SITU DE NÚCLEOS APOPTÓTICOS	168
18.1. Reactivos	169
18.2. Método	170
<b>RESULTADOS</b>	<b>173</b>
<b>A. VITAMINA A</b>	<b>175</b>
A.1. Signos clínicos	175
A.2. Niveles de vitamina A en plasma, hígado e hipocampo	176
A.3. Efectos de la vitamina A sobre el sistema somatostatinérgico	177
A.3.1. Expresión del gen de la somatostatina	177
A.3.2. Expresión de la prohormona convertasa 2	178
A.3.3. Receptores de somatostatina	179
A.3.3.1. Parámetros de unión de la somatostatina a sus receptores	179
A.3.3.2. Expresión de los receptores de somatostatina	181
A.3.4. Expresión de las quinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRK)	183
A.3.5. Efectos de la vitamina A sobre la vía de la adenilato ciclasa	184
A.3.5.1. Actividad adenilato ciclasa	184
A.3.5.2. Expresión de la adenilato ciclasa	185
A.3.5.3. Funcionalidad y expresión de las proteínas Gi	187
A.4. Efectos de la vitamina A sobre la fosforilación de CREB	189
A.5. Efectos de la vitamina A sobre la actividad fosfotirosina fosfatasa (PTP)	190
A.6. Efectos de la vitamina A sobre las defensas antioxidantes	190
A.6.1. Peroxidación lipídica	191
A.6.2. Niveles de glutatión (GSx)	191
A.6.3. Actividades catalasa y superóxido dismutasa	193
A.6.3.1. Actividad catalasa (CAT)	193
A.6.3.2. Actividad superóxido dismutasa (SOD)	193
A.6.3.3. Relación entre las actividades superóxido dismutasa y catalasa	194
A.7. Efectos de la vitamina A sobre la supervivencia celular	195
A.7.1. Apoptosis de células hipocampales	195
A.7.2. Análisis de vías implicadas en apoptosis y supervivencia celular	196
A.7.2.1. Fosforilación de ERK1/2 y Akt/PKB	196
A.7.2.2. Fosforilación de SAPK/JNK	197
<b>B. VITAMINA E</b>	<b>198</b>
B.1. Efectos de la deficiencia de vitamina E sobre el peso corporal	198
B.2. Niveles de vitamina E en plasma, hígado e hipocampo	199
B.3. Efectos de la vitamina E sobre el sistema somatostatinérgico	200



<b>B.3.1. Expresión del gen de la somatostatina</b>	<b>200</b>
<b>B.3.2. Receptores de somatostatina</b>	<b>201</b>
B.3.2.1. Parámetros de unión de la somatostatina a sus receptores	201
B.3.2.2. Expresión de los receptores de somatostatina	203
<b>B.3.3. Expresión de las quinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRK)</b>	<b>204</b>
<b>B.3.4. Efectos de la vitamina E sobre la vía de la adenilato ciclasa</b>	<b>206</b>
B.3.4.1. Actividad adenilato ciclasa	206
B.3.4.2. Expresión de la adenilato ciclasa	207
B.3.4.3. Funcionalidad y expresión de las proteínas Gi	208
<b>B.4. Efectos de la vitamina E sobre la fosforilación de CREB</b>	<b>210</b>
<b>B.5. Efectos de la vitamina E sobre la vía de las fosfotirosina fosfatasas</b>	<b>211</b>
<b>B.5.1. Actividad fosfotirosina fosfatasa</b>	<b>211</b>
<b>B.5.2. Expresión proteica de SHP-1 y PTP<math>\eta</math></b>	<b>213</b>
<b>B.5.3. Fosforilación de ERK</b>	<b>214</b>
<b>B.6. Efectos de la vitamina E sobre la proteína quinasa C-<math>\delta</math></b>	<b>215</b>
<b>B.7. Efectos de la vitamina E sobre la supervivencia celular</b>	<b>217</b>
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b><u>219</u></b>
1. VITAMINA A	223
2. VITAMINA E	235
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b><u>247</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b><u>253</u></b>
<b><u>ANEXO I: Publicaciones</u></b>	<b><u>I.1</u></b>
<b><u>ANEXO II: Financiación</u></b>	<b><u>II.1</u></b>
<b><u>ANEXO III: Summary</u></b>	<b><u>III.1</u></b>

## *Abreviaturas*

“No existe lo desconocido, sólo lo temporalmente desconocido”.

[James T. Kirk]



## ABREVIATURAS

<b>2AG:</b> 2-Araquidonoilglicerol	<b>CBP:</b> Proteína de unión a CREB
<b><math>\alpha</math>-CEHC:</b> 2,5,7,8-Tetrametil-2-[2' carboxi-etil] hidrocromano	<b>COX:</b> Ciclooxygenasa
<b><math>\alpha</math>-TTP:</b> Proteína de transferencia de $\alpha$ -tocoferol	<b>CRABP:</b> Proteína celular de unión al ácido retinoico
<b>A9CR:</b> Ácido 9- <i>cis</i> retinoico	<b>CRBP:</b> Proteína celular de unión a retinol
<b>AC:</b> Adenilato ciclasa	<b>CRE:</b> Elemento de respuesta a AMPc
<b>ACs:</b> Adenilato ciclasa soluble	<b>CREB:</b> Proteína de unión a CRE
<b>ACTH:</b> Corticotropina	<b>CRH:</b> Hormona liberadora de corticotropina
<b>ADH:</b> Hormona antidiurética	<b>DAG:</b> Diacilglicerol
<b>ADN:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>DEPC:</b> Dietilpirocarbonato
<b>ADNc:</b> ADN copia	<b>DMSO:</b> Dimetilsulfóxido
<b>ALDH:</b> Aldehído deshidrogenasa	<b>dNTP:</b> Desoxirribonucleótidos
<b>AMPA:</b> Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico	<b>eCB:</b> Endocanabinoide
<b>AMPc:</b> Adenosín 3',5' monofosfato cíclico	<b>EAE:</b> Encefalomiелitis autoinmune experimental
<b>AR:</b> Ácido retinoico	<b>EDTA:</b> Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ARN:</b> Ácido ribonucleico	<b>EGF:</b> Factor de crecimiento epidérmico
<b>ARNm:</b> ARN mensajero	<b>ER:</b> Ésteres de retinol
<b>ARNr:</b> ARN ribosómico	<b>ERK:</b> Quinasa dependiente de estímulos extracelulares
<b>ATP:</b> Adenosín 5'-trifosfato	<b>ERN:</b> Especies reactivas del nitrógeno
<b>ATTR:</b> Ácido todo- <i>trans</i> -retinoico	<b>ERO:</b> Especies reactivas del oxígeno
<b>BDNF:</b> Factor neurotrófico derivado del cerebro	<b>ET:</b> Ésteres de tocoferol
<b>BSA:</b> Albúmina sérica bovina	<b>FK:</b> Forskolina
<b>CA:</b> Cuerno de Ammón	<b>GABA:</b> Ácido gamma-amino-butírico
<b>CaM:</b> Calmodulina	<b>GD:</b> Giro dentado
<b>CaMK:</b> Quinasa dependiente de CaM	<b>GDP:</b> Guanosín 5'-difosfato
<b>CAT:</b> Catalasa	<b>GH:</b> Hormona del crecimiento
<b>CB1:</b> Receptor 1 de cannabinoides	<b>GMPc:</b> Guanosín 3',5' monofosfato cíclico
	<b>GPCR:</b> Receptor acoplado a proteínas G



<b>Gpp(NH)p:</b> 5'-Guanililimidodifosfato	<b>PKC:</b> Proteína quinasa C
<b>GPx:</b> Glutation peroxidasa	<b>PLA<sub>2</sub>:</b> Fosfolipasa A <sub>2</sub>
<b>GR:</b> Glutation reductasa	<b>PLC:</b> Fosfolipasa C
<b>GRK:</b> Quinasa de los GPCR	<b>PP2A:</b> Proteína fosfatasa 2A/Calcineurina
<b>GSH:</b> Glutation reducido	<b>PRT:</b> Proteína relacionada con el tocoferol
<b>GSSH:</b> Glutation oxidado	<b>PTK:</b> Tirosina quinasa
<b>GSx:</b> Glutation total	<b>PTP:</b> Fosfotirosina fosfatasa
<b>GTP:</b> Guanosín 5'-trifosfato	<b>RAR:</b> Receptor de ácido retinoico
<b>HDL:</b> Lipoproteína de alta densidad	<b>RARE:</b> Elemento de respuesta al ácido retinoico
<b>i.c.v.:</b> Intracerebroventricular	<b>RBP:</b> Proteína de unión a retinol
<b>i.p.:</b> Intraperitoneal	<b>RBPR:</b> Receptor de RBP
<b>IP3:</b> Inositol-1,4,5-trifosfato	<b>RDH:</b> Retinol deshidrogenasa
<b>JNK:</b> Quinasa Jun-amino terminal	<b>RXRE:</b> Elemento de respuesta a RXR
<b>LDL:</b> Lipoproteína de baja densidad	<b>RNR:</b> Receptor nuclear de retinoides
<b>LOX:</b> Lipooxigenasa	<b>RPTP:</b> PTP similar a receptor
<b>LPI:</b> Lípido poliinsaturado	<b>RXR:</b> Receptor X de retinoides
<b>LPL:</b> Lipoproteína lipasa	<b>SNC:</b> Sistema nervioso central
<b>LTD:</b> Depresión a largo plazo	<b>SNP:</b> Sistema nervioso periférico
<b>LTP:</b> Potenciación a largo plazo	<b>SOD:</b> Superóxido dismutasa
<b>MAPK:</b> Quinasa dependiente de mitógenos	<b>SST:</b> Somatostatina
<b>mGluR:</b> Receptor de glutamato metabotrópico	<b>SSTR:</b> Receptor de somatostatina
<b>μOP:</b> Receptor μ de opioides	<b>T3:</b> Triyodotironina
<b>NF-κB:</b> Factor nuclear κB	<b>T4:</b> Tiroxina
<b>NMDA:</b> N-metil D-aspartato	<b>TRH:</b> Hormona liberadora de TSH
<b>PC:</b> Prohormona convertasa	<b>TSH:</b> Tirotropina
<b>PDGF:</b> factor de crecimiento derivado de plaquetas	<b>TTR:</b> Todo- <i>trans</i> -retinol
<b>PEG:</b> Polietilenglicol	<b>TUNEL:</b> Marcaje del extremo 3'-OH libre por la desoxinucleotidil transferasa terminal
<b>PIP<sub>2</sub>:</b> Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato	<b>VA:</b> Vitamina A
<b>PKA:</b> Proteína quinasa A	<b>VE:</b> Vitamina E
<b>PKB:</b> Proteína quinasa B/Akt	<b>VLDL:</b> Lipoproteína de muy baja densidad

## *Introducción*

“Son vanas y están plagadas de errores las ciencias que no han nacido del experimento,  
madre de toda certidumbre”.  
[Leonardo da Vinci]







## 1. LAS VITAMINAS

### **1.1. DEFINICIÓN**

El término “vitamina” engloba a varias moléculas de distinta naturaleza química que se caracterizan por ser indispensables en el metabolismo de los seres vivos y necesarias para el correcto funcionamiento y desarrollo del organismo. Tanto su deficiencia como su exceso provocan graves enfermedades en los animales y, puesto que en la mayoría de los casos las vitaminas no pueden ser sintetizadas por ellos, necesitan ser ingeridas en la dieta.

Las vitaminas no tienen valor energético, pero actúan normalmente como precursoras de coenzimas de diversas proteínas y, por lo tanto, desempeñan un papel importante en el metabolismo. Además, algunas vitaminas tienen carácter antioxidante y ayudan a combatir los efectos de los radicales libres, por lo que han sido utilizadas desde hace años en medicina y cosmética como compuestos antienviejimiento (Lieberman y Bruning, 1997).

### **1.2. DESCUBRIMIENTO DE LAS VITAMINAS**

Desde la antigüedad, se sabe que determinadas enfermedades o dolencias tienen su origen en déficit alimentarios. Asimismo, determinados alimentos básicos que hoy conocemos por ser ricos en vitaminas, como la leche o la miel, eran recetados como medicamentos por Hipócrates contra el dolor de garganta o el estreñimiento. Ya en el Imperio Romano o en el Egipto faraónico la leche se consideraba un remedio contra el envejecimiento prematuro o el dolor de huesos y las damas de la alta sociedad como Popea Sabina, esposa del Emperador Nerón, o Cleopatra VII han pasado a la historia por tomar baños de leche de burra para conservar la piel joven y sana. Otro ejemplo de enfermedad



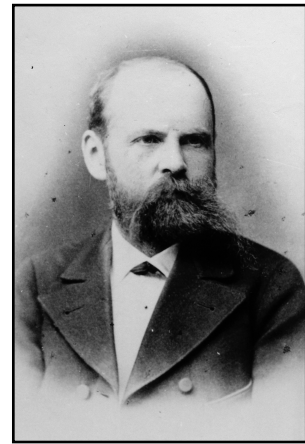
**James Lind**  
(1716-1794)

asociada a vitaminas es el escorbuto, que está causado por una deficiencia de vitamina C. Este mal fue el azote de los marineros de ultramar hasta que, a mediados del siglo XVIII, un médico de la Marina Británica llamado James Lind descubrió, en uno de los primeros ensayos de terapia controlada de la historia de la medicina, que los marineros afectados por escorbuto que tomaban zumo de limón y naranja evolucionaban favorablemente de su enfermedad. Los marineros ingleses comenzaron entonces a incluir limones y limas en su dieta para evitar el escorbuto, motivo por el cual fueron apodados como *limely*. Dicho remedio fue



seguido progresivamente por las Marinas del resto del mundo (Lieberman y Bruning, 1990; Challem, 1997).

A principios del siglo XX, los estudiantes de nutrición de diversos países estudiaban los componentes nutricionales necesarios para formar una dieta fisiológicamente completa. Por aquel entonces, se pensaba que una dieta equilibrada sólo requería cantidades adecuadas de proteínas, carbohidratos, grasas, sales minerales y agua. Los avances en química habían permitido purificar un gran número de estos principios inmediatos y se estaba investigando qué cantidad de cada uno de ellos era necesario para obtener una dieta sana y equilibrada. No obstante, pese al amplio rango de elementos a escoger y a todas las combinaciones que se ensayaron, ninguna dieta artificial conseguía que los animales alimentados con ella crecieran sanos y fuertes. El primer estudio registrado de este tipo se realizó en 1881 por N. Lunin y Gustav von Bunge en su laboratorio de Basilea (Suiza). En este estudio, alimentaron a ratones jóvenes con una mezcla de componentes de leche purificados (proteínas, grasas, hidratos de carbono y sales minerales) y comprobaron como, con esta leche sintética, los animales no se desarrollaban como los ratones alimentados con leche natural y morían a los 21 días. Sus autores concluyeron que la leche sintética carecía de algún tipo de “sustancia desconocida” sin la cual la vida no era posible. Estos trabajos, sin embargo, cayeron en el olvido y la comunidad científica de la época opinó que la razón por la cual los animales no se desarrollaban bien era, simplemente, que la leche artificial carecía de sabor y hacía que los ratones no la tomaran en cantidad suficiente, lo que desencadenaba, a la postre, la malnutrición y la muerte del animal (Rosenfeld, 1997).



**Gustav B. von Bunge**  
(1844-1920)

Años más tarde, en 1897, Christiaan Eijkman, un fisiólogo holandés, descubrió que la enfermedad conocida como polineuritis en animales y beriberi en humanos se podía inducir en pollos y palomas alimentándolos con una dieta estricta de arroz blanco. Además, observó que esta enfermedad se curaba alimentando a estos animales con arroz integral o salvado de arroz. Por aquel entonces, debido a la influencia de los trabajos de Pasteur, se pensaba que el beriberi lo causaba una bacteria, mientras que Eijkman sostenía que el origen estaba en algún tipo de toxina o germen presente en la semilla del arroz y que era contrarrestado por alguna sustancia existente en la cáscara del mismo. El discípulo de Eijkman, Gerrit Grijns, fue el



primero en clasificar el beriberi como una enfermedad cuyo origen estaba en una carencia nutricional y trató de aislar los componentes preventivos y curativos para la misma a partir de distintos alimentos básicos, llegando a la conclusión de que podía producirse por la falta de algún compuesto específico y desconocido presente en algunos alimentos (Rosenfeld, 1997).



**Kasimierz Funk**  
(1884-1967)

Finalmente, un químico llamado Kasimierz Funk, consideró que el factor identificado por Eijkman debía de ser una molécula orgánica específica perteneciente a un conjunto de moléculas cuya incorporación en minúsculas cantidades a la dieta eran las responsables de la curación y prevención de enfermedades como el beriberi, el escorbuto, el raquitismo o la pelagra. De manera paralela y trabajando sobre el salvado de arroz, un científico japonés llamado Umetaro Suzuki y el propio Funk aislaron en 1911 dos compuestos químicos diferentes (Funk, 1911; Suzuki, 1911). Suzuki denominó a su compuesto “ácido abérico”, puesto que curaba el beriberi, mientras que Funk obtuvo en realidad un concentrado de varios compuestos relacionados con la pirimidina que contenía, a su vez, pequeñas cantidades de ácido abérico. El concentrado de Funk era muy útil en el tratamiento de la pelagra (Griminger, 1972) y sus análisis sobre el mismo, cuyo componente mayoritario era el ácido nicotínico, determinaron que se trataba de un compuesto nitrogenado básico y que, posiblemente, se trataba de una amina. Dado que este compuesto parecía necesario para la vida, Funk lo llamó “vitamina” (Funk, 1912). A pesar de que se ha demostrado que no es una amina, el nombre se ha mantenido hasta la actualidad y se le ha dado a un gran número de sustancias que, independientemente de su estructura química, se encuentran en determinados alimentos y resultan esenciales para la vida.

### 1.3. CLASIFICACIÓN DE LAS VITAMINAS

Desde que Funk acuñó el término *vitamina* a principios del siglo XX, se han descubierto cada vez más compuestos químicos de distinta naturaleza que han resultado esenciales para la vida y que se han ido añadiendo a esta familia de moléculas.

En general, las vitaminas se clasifican en dos grandes subfamilias en función de su solubilidad en lípidos o agua. Por lo tanto, podemos distinguir entre vitaminas liposolubles y vitaminas hidrosolubles.



### **1.3.1. Vitaminas liposolubles**

Las vitaminas liposolubles se ingieren junto con la grasa de los alimentos y se almacenan generalmente en el hígado y en el tejido adiposo. Por consiguiente, el organismo suele disponer de un “almacén” de estas vitaminas y hacen falta largos periodos de déficit para que su concentración en el organismo disminuya hasta niveles patológicos. Por otro lado, un aporte excesivo de vitaminas liposolubles puede provocar que se almacenen hasta límites tóxicos y resulten perjudiciales.

Este grupo de vitaminas está compuesto por:

- ✓ Vitamina A o antixeroftálmica (Retinol).
- ✓ Vitamina D o antirraquítica (Calciferol).
- ✓ Vitamina E o fertilizadora (Tocoferol).
- ✓ Vitamina K o antihemorrágica (filoquinona).

De todas ellas, la vitamina K es la única de la que no se suelen necesitar aportes extra en la dieta, puesto que es sintetizada por la flora intestinal de la mayoría de los animales.

### **1.3.2. Vitaminas hidrosolubles**

Las vitaminas hidrosolubles suelen formar parte de coenzimas o son precursores de coenzimas, por lo que intervienen en numerosas reacciones metabólicas del organismo. Estas vitaminas no se almacenan en el organismo, por lo que es necesaria una mayor regularidad en su aporte para evitar la aparición de patologías asociadas a su carencia. Sin embargo, al excretarse con facilidad por la orina, no suelen tener efectos tóxicos aunque se ingieran en gran cantidad.

Este grupo de vitaminas está compuesto por:

- Complejo B, que engloba a:
  - ✓ Vitamina B1 o antiberibérica (Tiamina).
  - ✓ Vitamina B2 (Riboflavina).
  - ✓ Vitamina B3, también llamada PP o antipelagrosa (Ácido nicotínico).
  - ✓ Vitamina B5 (Ácido pantoténico).
  - ✓ Vitamina B6 (Piridoxina).
  - ✓ Vitamina B8, también llamada H (Biotina).
  - ✓ Vitamina B9, también llamada M (Ácido fólico).
  - ✓ Vitamina B12 o antiperniciosa (Cianocobalamina).



- Vitamina C o antiescorbútica (Ácido ascórbico).

### **1.3.3. Falsas vitaminas**

En los últimos tiempos, con el auge de la homeopatía y la dietética, han surgido nuevas “vitaminas” cuya importancia en el metabolismo está muy en tela de juicio. En la mayoría de los casos se ha demostrado que, si bien un aporte extra no es perjudicial, no son en absoluto esenciales puesto que, o bien el organismo es capaz de sintetizarlas por sí mismo o, directamente, no realizan ninguna función metabólica conocida. En otros casos se ha dado el nombre de “vitamina” con fines comerciales a algunos aminoácidos y ácidos grasos esenciales que, si bien son necesarios para nuestro organismo, no pueden ser considerados como vitaminas. Entre estos compuestos se pueden destacar el ácido pangámico (“vitamina B15”), la amigdalina (“vitamina B17”), el ácido orótico (“vitamina B13”) y los ácidos grasos linoleico y linolénico (“vitamina F”) (Ott y col., 1958; Young y Newberne, 1981).

## **1.4. LA VITAMINA A**

### **1.4.1. Descubrimiento de la vitamina A**

En 1907, en la Universidad de Wisconsin, el Profesor E. B. Hart estaba investigando las causas que provocaban malnutrición en las vacas alimentadas con piensos elaborados a partir de una única planta, como la avena, el trigo o el maíz. Los animales alimentados con trigo o avena presentaban un tamaño inferior a aquellos alimentados con maíz y, además, parían terneros prematuros y, a menudo, ciegos. Sin embargo, las vacas alimentadas con maíz crecían sanas y tenían descendencia completamente normal. Un alumno del profesor



**Elmer Verner McCollum**  
(1879-1967)

Hart, Elmer V. McCollum, basándose en los trabajos de Lunin y von Bunge, intentó averiguar qué compuesto existía en el maíz y faltaba en la avena y el trigo que resultaba fundamental para el desarrollo. Para ello, comenzó a trabajar junto con Marguerite Davis, utilizando ratas como animal de laboratorio, puesto que crecían y alcanzaban la madurez en mucho menos tiempo que animales de mayor tamaño. Su primer gran descubrimiento fue determinar que una dieta elaborada a partir de componentes purificados sólo hacía desarrollarse convenientemente a las ratas cuando las grasas que contenía



provenían de yema de huevo o mantequilla. Sin embargo, cuando esta misma dieta contenía grasas procedentes de aceite de oliva o de manteca de cerdo, las ratas desarrollaban a las pocas semanas conjuntivitis, ulceración de la córnea y ceguera (McCollum, 1967). Al compuesto que parecía estar presente en determinadas grasas y que evitaba la aparición de estos síntomas le llamaron “nutriente liposoluble A” (McCollum y Davis, 1913). Además, rebautizaron a la vitamina descubierta por Funk y Suzuki como “factor hidrosoluble B”, puesto que era eficaz en el tratamiento del beriberi pero no estaban de acuerdo con el término *vitamina*, ya que pensaban que no era más necesario para la vida que cualquier otro nutriente y, además, no era una amina. No obstante, el nombre que ha prevalecido hasta nuestros días es el acuñado por Funk en 1912 (Wolf, 2001).

### 1.4.2. Estructura de la vitamina A

El término “vitamina A” (VA) hace referencia a los compuestos cuya estructura deriva de un precursor llamado  $\beta$ -caroteno y cuya actividad biológica es similar a la del *trans*-retinol, que es el isómero mayoritario (Gerster, 1997). La estructura de este precursor natural fue descrita por Paul Karrer en 1930 (Karrer y Helfenstein, 1930), razón por la cual le fue otorgado el premio Nobel de Química en 1937. El  $\beta$ -caroteno, también llamado “provitamina A” presenta un esqueleto isoprenoide formado por 40 átomos de carbono con dobles enlaces conjugados y dos anillos  $\beta$ -ionona en sus extremos (Figura 1). La presencia de estos dobles enlaces y los anillos confieren al  $\beta$ -caroteno dos picos de absorbancia máxima a 465 y 490 nm. por lo que esta molécula y sus derivados presentan un color naranja-rojizo característico (Krisko y col., 2004).

El metabolismo del  $\beta$ -caroteno en el organismo por enzimas específicas da lugar a las

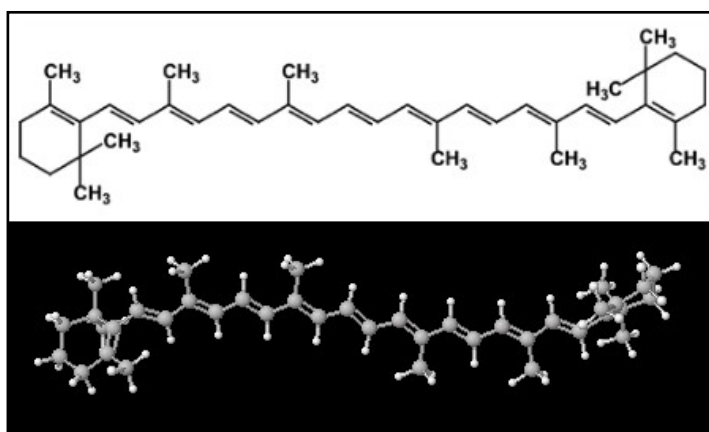


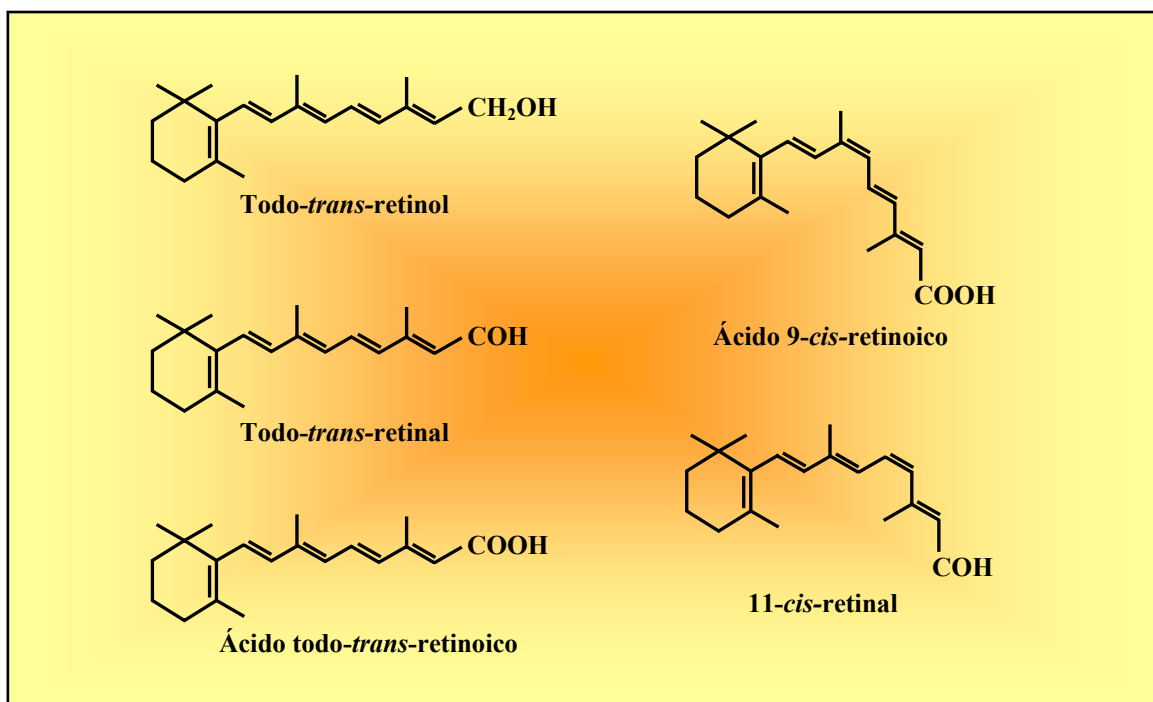
Figura 1: Estructura química del  $\beta$ -caroteno.

distintas formas de VA, todas ellas caracterizadas por ser diterpenos que mantienen en su estructura un anillo  $\beta$ -ionona (Gerster, 1997). La diferencia entre los distintos isómeros que forman la VA radica, por un lado, en la forma *cis* o *trans* de la cadena de carbono y, por otro, en la presencia de un grupo alcohol



(retinol), un grupo aldehído (retinal) o un grupo ácido (ácido retinoico) terminal (Figura 2). Por último, se diferencian en si se encuentran en forma libre o esterificados junto con algún ácido graso de cadena larga formando ésteres de retinol (ER), que es la forma mayoritaria de almacenamiento en el organismo (Goodman, 1984). Además de las formas naturales de la VA, la investigación sobre estas moléculas ha permitido sintetizar análogos derivados del retinol con mayor o menor actividad biológica relacionada con la VA, como la isotretionina (*Accutane*), el etetrinato (*Tigason*) o el adapaleno (*Differin*), usados en medicina para el tratamiento de distintas patologías dérmicas. En general, para englobar a todos los derivados del todo-*trans*-retinol, tanto naturales como artificiales, se utiliza el término “retinoides” (Olson, 1984; Blomhoff, 1994).

Tanto el retinol como los retinoides son compuestos hidrofóbicos y altamente inestables en presencia de oxígeno, lo que hace que pierdan actividad biológica en contacto con el aire. Además, presentan un efecto conocido como “fotoisomerización”, por lo que en presencia de luz, la molécula gira sobre sus enlaces C-C y pasa, con relativa facilidad, de la forma *trans* a un isómero *cis* (Debier y Larondelle, 2005). Para evitar estos efectos se recomienda trabajar con ellos en atmósferas pobres en oxígeno y bajo luz amarilla o roja (Oliveros y col, 2000).



**Figura 2:** Principales isómeros que constituyen la Vitamina A



### 1.4.3. Necesidades diarias de vitamina A

Actualmente se consideran necesarias las siguientes cantidades diarias (CDR) de VA en una dieta saludable (Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, 2001).

- Bebés:
  - ✓ 0-6 meses: 400  $\mu\text{g}/\text{día}$ <sup>1</sup>
  - ✓ 7-12 meses: 500  $\mu\text{g}/\text{día}$
- Niños:
  - ✓ 1-3 años: 300  $\mu\text{g}/\text{día}$
  - ✓ 4-8 años: 400  $\mu\text{g}/\text{día}$
  - ✓ 9-13 años: 600  $\mu\text{g}/\text{día}$
- A partir de 14 años: 800  $\mu\text{g}/\text{día}$



**Figura 3:** Cartel de prevención contra la ceguera nocturna del ejército estadounidense durante la 2ª guerra mundial donde se recomienda comer zanahorias y vegetales de hoja amarilla y verde.

La vitamina A en la dieta suele tomarse a partir de fuentes animales como los huevos, la carne, la leche, el queso, la crema de leche y el hígado de mamíferos y peces. También puede encontrarse en forma de su precursor natural, el  $\beta$ -caroteno, en las zanahorias, la calabaza, la batata, el melón, el calabacín, algunas frutas como el albaricoque, el brócoli, y la mayoría de las hortalizas de hoja verde (Figura 3).

En el primer mundo, la ingesta de las CDR de VA a partir de la dieta no supone ningún problema, por lo que rara vez es necesario un aporte extra. Sin embargo, en algunos países del África subsahariana y del sureste asiático las carencias alimentarias suelen desembocar en deficiencias vitamínicas que, en el caso de la VA ocasionan problemas respiratorios, fallos inmunitarios, ceguera y trastornos neurológicos.

<sup>1</sup> Es frecuente que la vitamina A se exprese en unidades internacionales (UI). No obstante, dado que en este trabajo se ha fijado la dosis de retinol en las ratas tratadas mediante  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , las cantidades diarias recomendadas también se han expresado así. Como referencia, 1 UI de vitamina A equivale a 0,3  $\mu\text{g}$  de retinol.





### **1.4.4. Metabolismo de la vitamina A**

#### **1.4.4.1. Absorción**

La VA se ingiere en la dieta a partir de la que se encuentra disuelta o almacenada en la grasa y el hígado de animales en forma de ER (Goodman, 1984; Debier y Larondelle, 2005), o bien en forma de  $\beta$ -caroteno contenido en determinadas plantas (Malik y col., 2000).

En el lumen intestinal, los ER son hidrolizados por acción de las esterasas pancreáticas generando retinol (Ong, 1994), el cual penetra, junto al  $\beta$ -caroteno, en el citoplasma de los enterocitos mediante difusión facilitada. Esta absorción de la VA depende mucho de las grasas tomadas en la dieta puesto que éstas facilitan la difusión a través de la membrana del epitelio intestinal (Olson, 1984; Blomhoff y col., 1994). Una vez en el citoplasma de los enterocitos, la mayor parte del  $\beta$ -caroteno sufre una ruptura oxidativa que genera dos moléculas de retinaldehído (retinal), que rápidamente son reducidas a retinol por la retinol deshidrogenasa. No obstante, el grado en que se produce esta síntesis de VA desde la provitamina A en los diferentes tejidos del organismo varía entre las distintas especies. Así, mientras que en los roedores la mayor parte se produce en los enterocitos, en los humanos se da preferentemente en el hígado (Doring y Harrison, 2004). El retinol formado se une entonces a una proteína específica llamada proteína celular de unión al retinol-II (CRBP-II, por sus siglas en inglés), que lo transporta a través del medio acuoso intracelular (Ong, 1994). La unión de esta molécula a la CRBP-II permite, además, su interacción con enzimas específicas implicadas en su metabolismo y protege tanto al retinol de la oxidación como a la propia célula del daño potencial que este compuesto podría generar sobre las membranas celulares (Blomhoff y col., 1994). Una pequeña parte de este retinol se puede transformar en su metabolito activo, el ácido retinoico (AR), y pasar a la circulación sanguínea asociado con la albúmina, pero la mayor parte va a ser esterificado nuevamente, como paso previo a su incorporación en los quilomicrones, por dos enzimas, la lecitina:retinol aciltransferasa (LRAT) y la Acetil CoA:retinol aciltransferasa (ARAT). La primera enzima esterifica el retinol unido a la CRBP-II mientras que la segunda enzima esterifica el retinol libre que queda sin unir a la proteína transportadora cuando, tras grandes ingestas de VA, se satura la CRBP-II (Debier y Larondelle, 2005). Estos ER pueden almacenarse en las gotas lipídicas o bien ser empaquetados en los quilomicrones y exocitarse al sistema linfático (Blomhoff y col., 1994; Ong, 1994) (Figura 4).



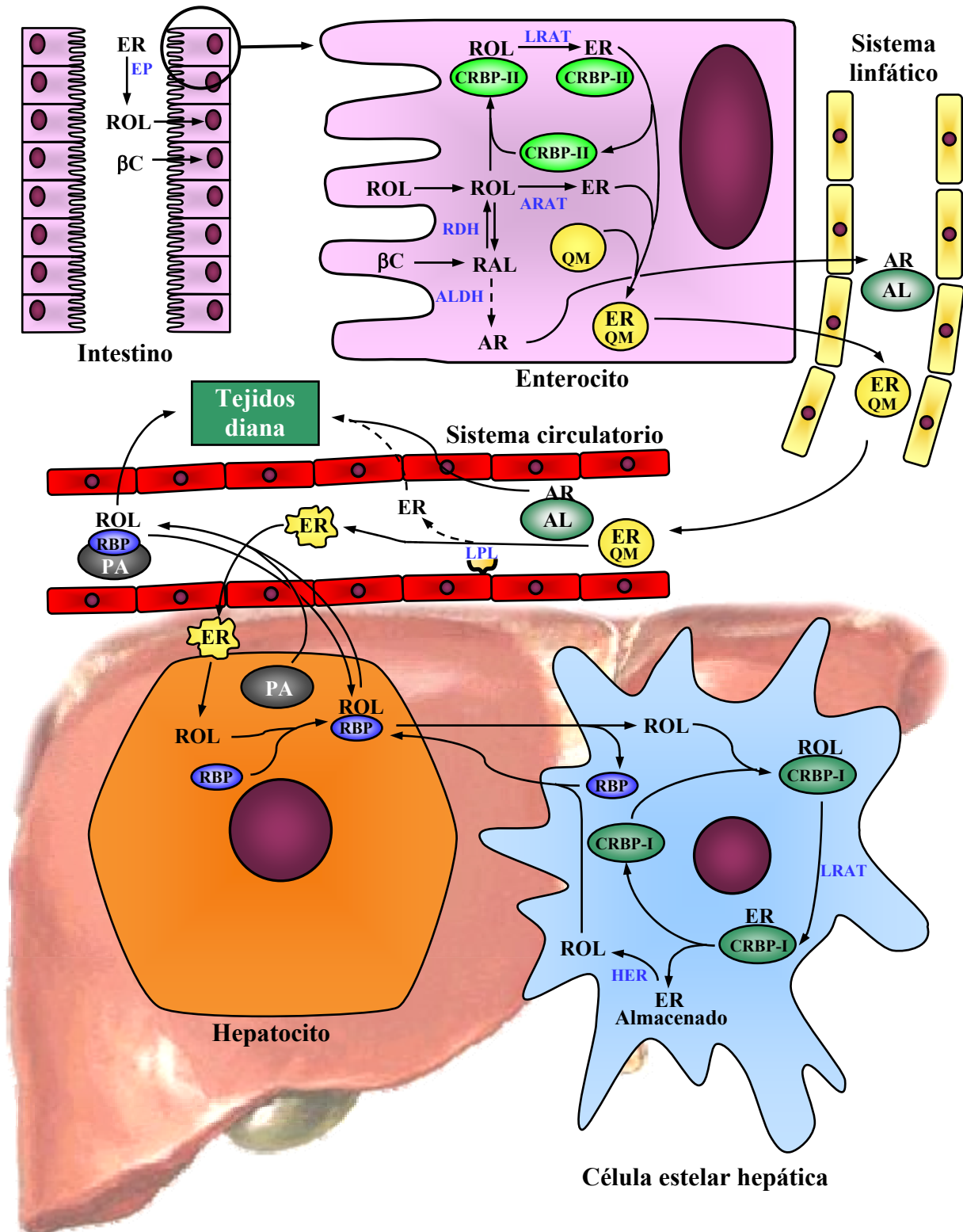
#### **1.4.4.2. Almacenamiento**

Los quilomicrones con los ER salen a la circulación general donde son parcialmente degradados por la lipoproteína lipasa (LPL), favoreciendo que pequeñas cantidades de ER se liberen al torrente sanguíneo y puedan ser absorbidos por los diferentes tejidos para su metabolismo (Blaner y col., 1994). Los quilomicrones remanentes son entonces captados por los hepatocitos del hígado, en cuyas membranas se hidrolizan los ER para dar lugar a retinol libre, que se transfiere al citoplasma celular, donde será captado por una pequeña proteína transportadora de aproximadamente 20 kDa llamada proteína de unión al retinol (RBP, por sus siglas en inglés). (Olson, 1984; Blomhoff y col., 1991). El retinol asociado a la RBP puede ser devuelto al torrente sanguíneo para ser utilizado por el resto de los tejidos o bien puede ser transportado a las células estelares, donde se asociará a la CRBP-I para ser reesterificado por la LRAT a formas como el palmitato de retinol, que es la forma mayoritaria en la que se almacena la VA en el organismo (Figura 4). Las células estelares del hígado en condiciones normales pueden contener hasta el 80% de la VA total del hígado y un 95% de la misma se encuentra en forma de ER (Blomhoff y col., 1985).

Aunque el hígado es el almacén principal de VA en la mayoría de los animales, se ha visto que esta vitamina puede acumularse también en otros tejidos. El tejido adiposo de la rata, por ejemplo, puede contener entre un 15% y un 20% de las reservas totales de VA del animal y también es capaz de realizar la misma ruta de síntesis e hidrólisis de los ER que se ha descrito en el hígado (Bonet y col., 2003).

#### **1.4.4.3. Transporte sanguíneo**

Cuando la cantidad de retinol libre en la sangre comienza a decaer, los ER de las células estelares se hidrolizan a retinol mediante la hidrolasa de ER y éste es mayoritariamente transportado a los hepatocitos, donde se asocia de nuevo a la RBP para ser liberada al torrente circulatorio en un proceso altamente regulado (Blomhoff y col., 1991). Más de un 90% del retinol plasmático se encuentra unido a la RBP y, a su vez, el 95% de la RBP se encuentra asociada a una proteína mayor, también sintetizada en el hígado y llamada prealbúmina (PA), que participa en el transporte de la tiroxina. (Olson, 1984; Sivaprasadarao y Findlay, 1994). La asociación de la RBP y la PA aumenta la afinidad del retinol por la RBP; sin embargo, no parece afectar a la tasa de unión de la PA con la tiroxina, siendo por tanto dos procesos independientes (Noy y Xu, 1990; Bellovino y col., 2003).



**Figura 4:** Absorción y almacenamiento de la vitamina A. AL: Albúmina; ALDH: aldehído deshidrogenasa; ARAR: AcetilCoa:retinol aciltransferasa; AR: ácido retinoico;  $\beta$ C:  $\beta$ -caroteno; CRBP: proteína celular de unión a retinol; EP: esterasas pancreáticas; ER: ésteres de retinol; HER: esterasa de ésteres de retinol; LRAT: lecitina:retinol aciltransferasa; LPL: lipoproteína lipasa; PA: prealbúmina; QM: quilomicrones; RAL: retinal; RBP: proteína de unión a retinol; ROL: retinol.



Tanto la RBP como la PA son las responsables de mantener los niveles plasmáticos de VA en condiciones fisiológicas normales y asegurar un suministro constante de este compuesto a los distintos tejidos del organismo incluso en periodos de carencia vitamínica (Green y Green, 1994). En estos periodos, el retinol absorbido por los hepatocitos es directamente liberado al torrente circulatorio unido a la RBP y, ante carencias graves, comenzarán a movilizarse los ER almacenados en las células estelares. Por ello, son generalmente necesarios largos periodos de deficiencia de VA para que los niveles en sangre se vean alterados (Debier y Larondelle, 2005).

#### **1.4.4.4. Incorporación de la vitamina A a los tejidos diana**

La VA es necesaria en todos los tejidos del organismo y se piensa que penetra en las células tanto mediante transporte pasivo como a través de un receptor de RBP que se ha encontrado en algunas células (Blomhoff y col., 1991). Dicho receptor posee 9 dominios transmembrana, un extremo N-terminal extracelular, un extremo C-terminal citoplasmático y un sitio de unión para la RBP en el tercer bucle extracelular (Kawaguchi y col., 2007). No obstante, el mecanismo específico por el cual estos receptores reconocen a la RBP no se conoce con exactitud y se piensa que podría variar en función del tejido. Algunos autores piensan que en algunos tejidos, como el riñón o el hígado, se produce la endocitosis del complejo receptor-RBP y el retinol es liberado posteriormente en los lisosomas (Flower, 2000). Otros autores, sin embargo, sugieren que el retinol se disocia de la RBP en el medio extracelular y este se transporta pasivamente al interior de la célula a través del receptor de RBP que, por tanto, actuaría como un poro selectivo (Noy y Xu, 1990).

El retinol, una vez dentro de las células del tejido diana se va a unir de nuevo a la proteína CRBP-I que lo transportará por el citoplasma. Si no es almacenado en forma de ER, el retinol sufrirá dos oxidaciones metabólicas sucesivas que lo transformarán en AR (Debier y Larondelle, 2005). La primera reacción, que es reversible y está catalizada por una alcohol deshidrogenasa, una deshidrogenasa de cadena corta o algún miembro de la familia del citocromo P450 (CiP) (Chen y col., 2000; Marill y col., 2003), dará como producto retinal. Este retinal es captado por las proteínas celulares de unión al AR I y II (CRABP, por sus siglas en inglés) (Bellovino y col., 2003; Debier y Larondelle, 2005) y oxidado a AR en una reacción irreversible por medio de una aldehído deshidrogenasa o algunos miembros de la familia CiP (Zhang y col., 2000; Marill y col., 2003). Mientras que CRABP-I es una proteína



expresada de forma ubicua, CRABP-II se expresa sólo en la piel, el útero, el plexo coroideo, algunas neuronas colinérgicas y la piamadre (Dong y col., 1999), considerándose esta isoforma como un reservorio de retinoides en neuronas adultas (Zetterstrom y col., 1999).

Por otro lado, el complejo CRABP-AR puede ser posteriormente metabolizado por reacciones de isomerización, descarboxilación o glucuronidación para originar toda una serie de retinoides con mayor o menor actividad biológica (Debier y Larondelle, 2005). Entre estos metabolitos destacan el ácido todo-*trans*-retinoico (ATTR), el ácido 9-*cis*-retinoico (A9CR), el todo-*trans*-4-oxo retinol o el glucuronato de retinol, que serán finalmente excretados por la bilis y la orina.

### **1.4.5. Mecanismo de acción de la vitamina A**

#### **1.4.5.1. Receptores ácido retinoico**

El complejo CRABP-AR se traslada al núcleo celular, en donde el AR puede unirse a unos receptores denominados receptores nucleares de retinoides (RNR), que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas y actúan como factores de transcripción activados por ligando (Mangelsdorf y col., 1995; Chambon, 1996; Lane y Bailey, 2005). Existen dos tipos de RNR, los receptores de ácido retinoico (RAR) y los receptores X de retinoides (RXR). Mientras que el ATTR se une únicamente a los RAR, el A9CR puede unirse a ambos, si bien los RXR tienen mucha más afinidad por este retinoide que los RAR (Clagett-Dame y DeLuca, 2002; Bonet y col., 2003).

Se han encontrado tres isoformas de los RAR y de los RXR denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , cada una codificada por un gen diferente en el que existen múltiples promotores. Además, el ARNm de los RNR puede sufrir procesamientos alternativos originando así distintas isoformas del mismo subtipo de receptor. Por consiguiente, el resultado final es una amplísima variedad de receptores de retinoides. Se han encontrado diferencias en la expresión de estos subtipos de RNR entre los distintos tejidos y células del organismo así como patrones temporales de máxima expresión que hacen pensar que cada isoforma podría cumplir una función específica en un momento determinado del desarrollo (Krezel y col., 1999; Zetterstrom y col., 1999; Lane y Bailey, 2005). En la [Tabla 1](#) se detalla la distribución de los distintos subtipos de RNR en el sistema nervioso central (SNC) adulto (Krezel y col., 1999; Lane y Bailey, 2005).



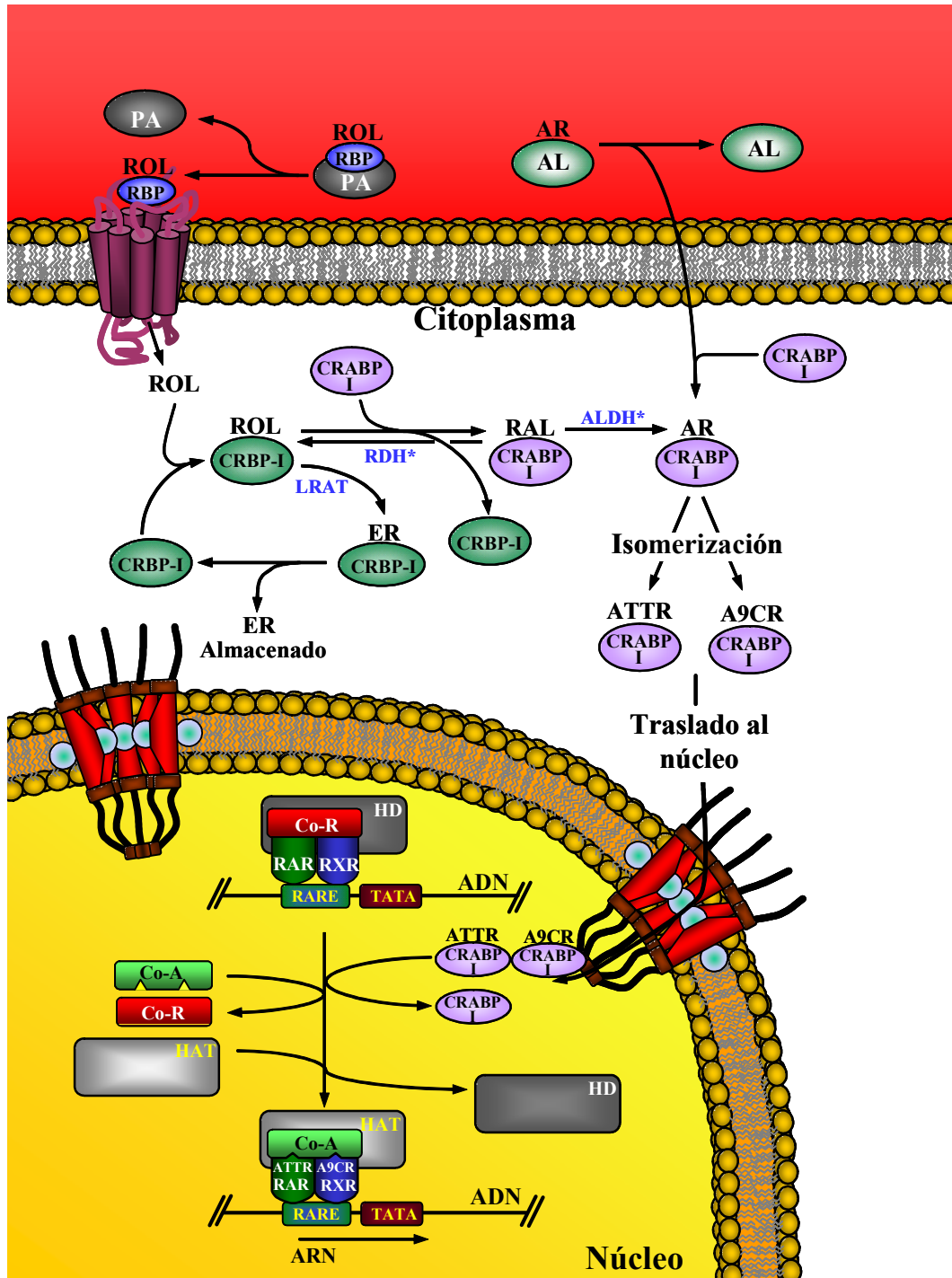
Los RNR existen normalmente en forma de dímeros, normalmente heterodímeros RAR/RXR que se hallan unidos al ADN en regiones del promotor próximas a la caja TATA denominadas elementos de respuesta al AR (RARE, por sus siglas en inglés). En ausencia de ligando, se encuentran unidos a un co-represor (Co-R) y a un complejo proteico de histona-desacetilasas que los mantiene inactivos. La unión del ATTR al RAR induce un cambio conformacional en éste que provoca, por un lado, la disociación del Co-R y la unión de un coactivador (Co-A) que activa el dímero y, por otro lado, la unión de un complejo proteico con actividad histona-acetiltransferasa (HAT) (Lane y Bailey, 2005). Una vez activo, el conjunto RAR/RXR/Co-A/HAT descondensa la cromatina y permite la unión de las proteínas que forman la maquinaria transcripcional (Mangelsdorf y col., 1995; Kastner y col., 1997) (Figura 5).

Se ha visto que la activación del dímero RAR/RXR por ligandos específicos del RXR no provoca transcripción génica en ausencia de ATTR. Este efecto se conoce como “dominancia RAR” (Kurokawa y col., 1994) y tiene sentido biológico puesto que el isómero A9CR, principal activador de los RXR, es prácticamente indetectable *in vivo* (Mic y col., 2003). No obstante, una vez que los RAR están activos y formando heterodímeros con un RXR, la unión del A9CR puede incrementar su eficacia para reclutar el Co-A y el complejo HAT (Minucci y col., 1997).

Proteína	Localización en el sistema nervioso central adulto.
RAR $\alpha$	Bulbo olfativo, especialmente en la capas glomerular, taenia tecta, corteza frontal y parietal, campos del cuerno de Amón del hipocampo y giro dentado (en la rata), núcleos amigdaloides basolaterales y laterales, tálamo, lóbulos cerebelosos, hipófisis, plexo coroideo, puente cerebral, indusium y capas IV – X de la médula espinal.
RAR $\beta$	Putamen, caudado, núcleo accumbens, núcleos infundibular y dorsomedial del hipotálamo, tracto solitario, área postrema y núcleo reticular rostroventrolateral de la médula oblonga y glándula pituitaria.
RAR $\gamma$	Se detectan bajos niveles en la mayor parte de las regiones diencefálicas y rombencefálicas, especialmente en el hipocampo.
RXR $\alpha$	Apenas detectado.
RXR $\beta$	Se detectan bajos niveles de forma ubicua.
RXR $\gamma$	Putamen, caudado, núcleo accumbens, hipotálamo e hipófisis.

**Tabla 1:** Distribución de los distintos receptores de retinoides en el sistema nervioso central adulto.





**Figura 5:** Actuación de la vitamina A mediada por receptor en los tejidos diana. AL: Albúmina; ALDH\*: aldehído deshidrogenasa; AR: ácido retinoico; ATTR: ácido todo-*trans*-retinoico; A9CR: ácido 9-*cis*-retinoico; Co-A: coactivador; Co-R: co-represor; CRABP: proteína celular de unión al ácido retinoico; CRBP: proteína celular de unión al retinol; ER: ésteres de retinol; HAT: complejo de histona acetil-transferasas; HD: complejo de histona desacetilasas; LRAT: lecitina:retinol aciltransferasa; PA: prealbúmina; RAR: receptor de ácido retinoico; RBP: proteína de unión a retinol; RBPR: receptor de RBP; RDH: retinol deshidrogenasa\*; RXR: receptor X de retinoides. Las reacciones catalizadas por las enzimas marcadas con un asterisco (\*) pueden ser realizadas por otras enzimas, ver apartado 1.4.3. para más detalles



Por otro lado, los RXR pueden también formar dímeros con otros RXR. Estos dímeros RXR/RXR activos se pueden unir al promotor de numerosos genes por secuencias conocidas como elementos de respuesta a los RXR (RXRE, por sus siglas en inglés), regulando así la transcripción de los mismos (Malik y col., 2000). Además, los RXR pueden asociarse a otros receptores, tales como los receptores de hormonas tiroideas, los receptores de vitamina D, los receptores X hepáticos así como a un gran número de proteínas capaces de unirse a los RXR cuya función no está clara y que se denominan receptores huérfanos relacionados con RAR (Clagett-Dame y DeLuca, 2002; Bonet y col., 2003; Marill y col., 2003).

Recientemente, se ha visto que existe un mecanismo de regulación de los RNR mediante fosforilación que permite tanto aumentar la capacidad de los RNR para activar la transcripción como inactivar dichos receptores. Se han encontrado numerosas quinasas implicadas en procesos proliferativos y apoptóticos, como las proteína quinasas A y C (PKA y PKC), las quinasas dependientes de ciclina (CDK), la quinasa dependiente de estímulos extracelulares (ERK) o las quinasas Jun amino-terminal (JNK) y p38 (Bastien y Rochette-Egly, 2004), que tienen capacidad para fosforilar los RNR. Esta fosforilación, en función de dónde se produzca, aumentará la capacidad de los receptores para iniciar la transcripción o será una señal para la ubiquitinación de los mismos y su posterior degradación por el proteosoma. La fosforilación en el residuo de serina 369 de RAR $\alpha$  por la PKA, por ejemplo, incrementa la capacidad de este receptor para reclutar la maquinaria transcripcional, mientras que la fosforilación mediada por p38 parece ser la señal para que se produzca la disociación del dímero RAR/RXR y su ubiquitinación (Gianni y col, 2003; Bastien y Rochette-Egly, 2004).

Aunque la respuesta a la activación de los RNR suele ser un aumento de la transcripción de los genes en cuyo promotor existen RARE, también se ha descrito un mecanismo por el cual los retinoides pueden inhibir la transcripción génica por una vía independiente de sus elementos de respuesta. Este efecto lo induce el heterodímero RAR/RXR activado por ATTR inhibiendo la actividad del factor de transcripción AP-1. Dado que AP-1 está implicado en la transcripción de genes proliferativos, esta inhibición desencadenaría un efecto antiproliferativo de los retinoides. Por lo tanto, la interacción entre AP-1 y RAR/RXR podría actuar como un “interruptor” que hace que una célula pase de un





estado proliferativo a un estado diferenciado (Salbert y col., 1993; de Vos y col., 1997; Piedrafita y Pfahl, 1999; Lane y Bailey, 2005).

#### **1.4.5.1.1. Elementos de respuesta a retinoides**

Como se ha explicado en el apartado anterior, el aumento de la transcripción génica inducido por la VA se produce por la unión de los RNR a unas regiones que se encuentran en el promotor de numerosos genes.

Los elementos de respuesta a la VA se pueden clasificar en dos grandes categorías en función del tipo de dímero que se une a ellas. Así, podemos distinguir entre los RARE, a los que se une el heterodímero RAR/RXR y los RXRE, a los que se une el homodímero RXR/RXR (Soprano y col., 2004). Los RARE están compuestos por repeticiones directas (DR, por sus siglas en inglés) de una secuencia consenso, AGGTCA, separadas por 2 (DR-2) ó 5 (DR-5) pares de bases, mientras que los RXRE suelen estar formados por repeticiones de la misma secuencia separadas por un único par de bases (DR-1). Por lo tanto, parece que esta separación y el número de veces que se repite la secuencia son determinantes en la especificidad por el subtipo de receptor que se une a ellas (Lane y Bailey, 2005; Mangelsdorf, 1994; Soprano y col., 2004).

A estos elementos de respuesta también se pueden unir otros receptores nucleares como los receptores huérfanos COUP-TF, Tor y Tak-1 (Tran y col., 1992; Hirose y col., 1995; Ortiz y col., 1995). La unión de estos receptores impide la unión de los dímeros de RNR, por lo que actúan como inhibidores de la transcripción inducida por AR y podrían considerarse como moduladores de la actividad de la VA mediada por receptor (Lane y Bailey, 2005).

Por otro lado, aunque se ha visto que la expresión de numerosas proteínas se encuentra modificada por la VA, no se sabe en muchos casos si dicha modificación se debe a la presencia de RARE en el promotor de sus genes o a que la VA modifica la expresión de terceras proteínas implicadas en la regulación de esos mismo genes y, por tanto, actúa como un modulador putativo (Lane y Bailey, 2005). En la [Tabla 2](#) se encuentra un resumen general de algunas de las proteínas de líneas celulares neuronales cuya transcripción está regulada por la VA, ya sea directa o indirectamente (Lane y Bailey, 2005).



Gen	Efecto de la VA en la expresión	Línea celular o tejido.
<b>Transportadores</b>		
Transportador de noradrenalina	↑	PC12, SCG
Transportador de acetilcolina	↑	PC12, SN56, NG108
Transportador del ácido $\gamma$ -amino butírico (GABA)	↑	P19
<b>Enzimas metabólicas</b>		
Colina acetiltransferasa	↑	PC12, SN56, NG108-15, SCG
Tirosina hidrolasa	↓	SCG
Dopamina $\beta$ -hidroxilasa	↓	SCG
Ácido glutámico descarboxilasa	↑	P19, NE-7C2
Acetilcolinesterasa	↑	P19
<b>Receptores acoplados a proteínas G</b>		
Receptor de opioides $\mu$	↑/↓	SH-SY5Y
Receptor de opioides $\delta$	↑	NG108-15
Receptor de opioides $\kappa$	↓	P19
Receptor de serotonina 5-HT <sub>1A</sub>	↑	SN-48
Receptor de dopamina D2	↑	Estriado
<b>Receptores ionotrópicos</b>		
Receptor nicotínico AchR $\alpha$	↑	NT2
Receptor de N-metil-D-aspartato	↑	P19
Receptor de kainato	↑	NG108-15
Receptor de GABA $\gamma$ 2	↑	P19
<b>Proteínas transportadoras de iones</b>		
Canales de K <sup>+</sup>	↑	SH-SY5Y, SK-N-BE
Intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	↑	P19
Canales de Ca <sup>2+</sup> tipo L y N	↑	NG108-15, NT2
<b>Proteínas de citoesqueleto</b>		
Proteínas M, L y H de neurofilamentos	↑	P19
Tenascina	↑	SH-SY5Y
Integrinas $\alpha/\beta$	↑	SH-SY5Y
<b>Moléculas de señalización intracelular</b>		
Fosfolipasas A2, C y D	↑	LA-N-1
Ácido araquidónico	↑	SK-N-BE
Óxido nítrico sintasa neuronal	↑	SN56
Neuromodulina	↑	Estriado
Neurogranina/RC3	↑	SK-N-BE, Estriado
Enolasa neuronal	↑	N-115, PC12
Sinapsinas I, II y III	↑	NT2
<b>Otros</b>		
Hormona liberadora de gonadotropina	↑/↓	GT1-1, Hipotálamo
Oxitocina	↑	Neuro2A
Trk A/Trk B	↑	NB, P19
Presenilinas 1 y 2	↑	SH-SY5Y, P19
Apolipoproteína E	↓	NT2
Proteína precursora de amiloide	↑	P19, SH-SY5Y, Hipocampo
Proteína TAU	↑	P19

**Tabla 2:** Efecto de la vitamina A sobre la síntesis de algunas proteínas y moléculas neuronales.



#### **1.4.5.2. Vía citosólica de acción**

Aunque la mayor parte de las acciones conocidas de la VA están mediadas por los RNR, cada vez más autores defienden la existencia de una “vía citosólica alternativa” que añadiría toda una nueva serie de acciones para esta vitamina. En el momento actual se están realizando numerosas investigaciones en esta vía y se ha visto, por ejemplo, que los retinoides son capaces de formar enlaces covalentes con algunas enzimas en un proceso conocido como *retinoilación*, modificando sus propiedades y su actividad (Marill y col., 2003). Este proceso resulta fundamental en la visión, en la que, tal como se explica más adelante, una molécula de 11-*cis*-retinal unida covalentemente a una proteína llamada opsina, presente en los fotorreceptores de la retina, es la que permite a esta última generar una señal nerviosa ante un estímulo lumínico (Debier y Larondelle, 2005).

Por otro lado, se ha visto que los retinoides pueden actuar, tanto *in vitro* como *in vivo*, como antioxidantes gracias a su cadena de dobles enlaces alternos capaz de quelar el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) y estabilizar los radicales peroxilo (Stahl y col., 1994; Palace y col., 1999). No obstante, este efecto antioxidante se está investigando más a fondo, ya que se ha visto que dosis elevadas de VA en el organismo pueden conducir también a un estado prooxidativo en algunos tejidos (de Oliveira y col., 2007).

#### **1.4.6. Funciones de la vitamina A en el organismo**

Por su capacidad para regular la transcripción de numerosos genes, actuar como cofactor proteico y modular la actividad de determinadas enzimas mediante las vías de explicadas en el apartado anterior, la VA juega un papel importante en numerosos procesos biológicos fundamentales para los animales. De los distintos metabolitos de la VA, el retinol parece ser esencial en la reproducción mientras que el retinal es fundamental en la visión (Thompson y col., 1963; Maden y col., 1998; Debier y Larondelle, 2005). Por su parte, el AR, que es el metabolito más activo, está implicado en la modulación de la respuesta inmune, el crecimiento, el desarrollo y los procesos de aprendizaje y memoria (Bliss y Collingridge, 1993; Eskild y col., 1994; Maden, 1994).

##### **1.4.6.1. Papel de la vitamina A en la visión**

El retinoide fundamental en la visión es el 11-*cis*-retinal, que participa en la visión nocturna y en la percepción del color. Este retinoide se encuentra covalentemente unido a la opsina, presente en los fotorreceptores de la retina (Zile y Cullum, 1983), tanto en los conos,



encargados de la percepción del color y de la visión en condiciones de alta luminosidad, como en los bastones, encargados de la visión en condiciones de baja luminosidad (Debier y Larondelle, 2005).

En presencia de luz, el 11-*cis*-retinal se transforma en todo-*trans*-retinal y, a continuación, se hidroliza, separándose de la opsina que pasa a su forma activa denominada metarrodopsina II (Olson, 1984). En este estado, la proteína desencadena una cascada de señales dependientes de guanosín 5'-monofosfato cíclico (GMPC) cuyo resultado final es el bloqueo de los canales iónicos y la generación de un potencial nervioso (Pugh y Lamb, 1990). El todo-*trans*-retinal que se ha liberado es reducido a todo-*trans*-retinol por una alcohol deshidrogenasa, isomerizado a 11-*cis*-retinol por una isomerasa y oxidado de nuevo a 11-*cis*-retinal por una retinol deshidrogenasa. Una vez en oscuridad, el 11-*cis*-retinal vuelve a unirse a la opsina, volviendo así al estado de reposo (Zile y Cullum, 1983; Lamb y Pugh, 2004; Debier y Larondelle, 2005). Dado que durante todo este proceso alguna de las moléculas de todo-*trans*-retinol generadas a partir del 11-*cis*-retinal son metabolizadas por la maquinaria celular a otros metabolitos de la VA, como el ATTR, es necesario un aporte continuo de todo-*trans*-retinol a las células de la retina para asegurar el funcionamiento del sistema de fotorrecepción. Esto provoca que dos de los primeros síntomas de una carencia de vitamina A sean la visión doble y la ceguera nocturna (Basu y Dickerson, 1974).

#### **1.4.6.2. Papel de la vitamina A en la reproducción**

Se ha demostrado que una carencia de VA provoca infertilidad o fallos en el aparato reproductor. Ante una falta severa de VA, por ejemplo, la vagina permanece queratinizada y el ciclo estral llega a desaparecer (Bates, 1983).

Durante el embarazo la VA es fundamental, desde la implantación del embrión hasta el nacimiento, y su déficit provoca desde malformaciones congénitas hasta reabsorción y muerte fetal (Bates, 1983; Clagett-Dame y DeLuca, 2002). En este sentido, aunque se ha observado que el AR es esencial para un correcto desarrollo embrionario, parece ser que el retinol también es imprescindible para evitar la reabsorción del feto (Thompson y col., 1963; Wellik y col., 1997; Debier y Larondelle, 2005) puesto que ambas formas de VA estimulan la producción de progesterona (Bates, 1983; Chew, 1993).

Por otro lado, se sabe que tanto el retinol como el AR están implicados en la regulación de la función testicular y, del mismo modo que en las hembras una carencia de



VA induce la desaparición del ciclo estral, en los machos produce fallos en la producción de testosterona y detención de la espermatogénesis (Thompson y col., 1963; Chew, 1993; Livera y col., 2002). Se ha demostrado, además, que los retinoides ejercen un papel regulador sobre los tres tipos celulares implicados en la producción y maduración de los espermatozoides, es decir, las células de Sertoli, las células germinales y las células de Leydig (Livera y col., 2002) y que sus efectos parecen ocurrir por un mecanismo dependiente de los RAR (Akmal y col., 1997; Debier y Larondelle, 2005).

#### **1.4.6.3. Papel de la vitamina A en el crecimiento y desarrollo**

Durante la gestación, la VA en forma de retinol libre o ER pasa al feto a través de la placenta en un proceso que es fundamental para el desarrollo embrionario, ya que los retinoides están implicados en los procesos de crecimiento y diferenciación celular (Thompson, y col., 1964; Zachman, 1995). De hecho, los niveles fetales totales de VA se mantienen más o menos constantes, a no ser que las reservas de la madre se agoten (Ross y Gardner, 1994).

Se ha demostrado que la VA es necesaria para el correcto desarrollo del corazón, el esqueleto, los sistemas vascular y nervioso y los pulmones (Mendelsohn y col., 1999; Massaro y Massaro, 2000; Maden, 2002; Debier y Larondelle, 2005). De hecho, al inicio de la gestación, pueden encontrarse niveles altos de palmitato de retinol que van disminuyendo a lo largo del desarrollo embrionario, lo que demuestra la importancia de dicha vitamina durante esta etapa (Zachman y col., 1984). Por otro lado, se sabe que, desde los primeros estadios embrionarios, las células comienzan a expresar muchas de las proteínas implicadas en el metabolismo de los retinoides y que esta expresión no se produce de manera ubicua, sino que existen patrones específicos de distribución tanto espaciales como temporales (Biesalski y Nohr, 2003). Este hecho se refleja en procesos tan elementales como la diferenciación del eje antero-posterior del embrión o la diferenciación de las extremidades (Maden, 1994; Stoilov, 2001). Una de las excepciones es la RBP, que no comienza a expresarse hasta las últimas semanas de la gestación, momento en que el feto comienza a acumular VA en el hígado. En el momento del nacimiento, sin embargo, los niveles de VA son aún tan escasos y las necesidades del organismo tan elevadas, que el calostro y la leche materna, ricos en ER, se hacen indispensables para el correcto desarrollo del recién nacido (Ross, 1982; Davila y col., 1985; Debier y col., 2004).



Con respecto a la vía de señalización de los retinoides, se ha demostrado que los RAR regulan numerosos genes relacionados con el desarrollo, como los *homeobox* y los genes de distintos factores de crecimiento, lo que explica el por qué una hipovitaminosis A en la madre produce graves deformaciones congénitas al feto (Debier y Larondelle, 2005).

Por otro lado, se ha observado que un exceso de VA tiene efectos teratogénicos y, debido precisamente a los patrones de distribución de las enzimas implicadas en el metabolismo de los retinoides, el momento en que se produce esa hipervitaminosis determina el tipo de malformación que suele desarrollar el embrión (Bates, 1983; Ross y col., 2000; Stoilov, 2001; Debier y Larondelle, 2005). Por este motivo, se suelen recetar también anticonceptivos orales durante tratamientos médicos con derivados de los retinoides, como *Accutane*, y hasta un tiempo después del tratamiento para que los niveles de VA en el organismo vuelvan a la normalidad.

#### **1.4.6.4. Papel de la vitamina A en la respuesta inmune**

Se ha demostrado que los animales de laboratorio con deficiencia de VA tienen mayor tendencia a desarrollar infecciones debido a fallos en la respuesta inmune que aquellos alimentados con una dieta completa (Blomhoff y col., 1994) y que el ATTR y el A9CR regulan la respuesta inmune (Semba, 1998). Estos dos retinoides intervienen en la diferenciación, desarrollo y apoptosis de las células inmunes del organismo por lo que, ante una carencia de VA, se producen fallos, por un lado, en la función de los linfocitos, células *natural-killer* (NK) y neutrófilos y, por otro lado, en la producción de anticuerpos (Semba, 1998; Stephensen, 2001; Debier y Larondelle, 2005). Sin embargo, el modo en que la VA regula todos estos procesos aún no ha sido del todo aclarada (Stephensen, 2001).

#### **1.4.6.5. Papel de la vitamina A sobre las células epiteliales**

Dado que la VA es un elemento esencial para la diferenciación celular, resulta fundamental en el mantenimiento de los epitelios del organismo, tales como el epitelio genital, gastrointestinal o respiratorio y, también, en la regulación de los queratinocitos oculares (McCullough y col., 1999; McLaren, 1999; Debier y Larondelle, 2005). La VA regula la proliferación de las células epiteliales a través de sus receptores RAR y RXR, por lo que su deficiencia genera problemas a este nivel (McCullough y col., 1999).



Entre los síntomas más característicos de la deficiencia de VA destacan la pérdida de células ciliadas en el tracto respiratorio, cambios en la morfología de los epitelios y aumento de su queratinización, así como un descenso en la producción de moco (Rosenthal y col.,



**Figura 6:** Xeroftalmia asociada a la falta de vitamina A.

1994). Todos estos efectos, sumados a los fallos en el sistema inmune, aumentan considerablemente la incidencia de enfermedades cutáneas y respiratorias ante un déficit de VA. El ejemplo más claro de este problema se encuentra en la *Xeroftalmia* (Figura 6), un estado patológico caracterizado por una queratinización de las corneas unida a un crecimiento de microorganismos y hongos en las conjuntivas que desemboca en ulceración y pérdida funcional de los ojos (McLaren, 1999).

#### 1.4.6.6. Papel de la vitamina A en el sistema nervioso central

Se ha observado que la VA tiene una función importante tanto en el desarrollo del SNC durante la gestación como, posteriormente, durante la etapa adulta, en el mantenimiento de sus funciones (Zhuang y col., 1995; Debier y Larondelle, 2005). De hecho, a lo largo de toda la vida, se expresan RNR en numerosas regiones cerebrales que demuestran la existencia de una vía de señalización mediada por retinoides en el cerebro adulto (Mey y McCaffery, 2004).

Por otro lado, el análisis genético de los componentes del sistema retinoico en pacientes con patologías nerviosas ha permitido demostrar la implicación de dicho sistema y, por tanto, de la VA, en enfermedades como la esquizofrenia, la depresión, la enfermedad de Parkinson o la corea de Huntington (Goodman, 1998; Goodman y Pardee, 2003; Hull y D'Arcy, 2003; Mey y McCaffery, 2004).

Se han encontrado numerosos genes relacionados con los sistemas de neurotransmisión que se encuentran regulados, directa- o indirectamente, por la VA (Tabla 2). El AR, por ejemplo, puede estimular la síntesis de la ácido glutámico descarboxilasa, implicada en la síntesis del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y se ha demostrado una regulación mediada por retinoides en la expresión del receptor D2 de dopamina (Samad y col., 1997), de la hormona liberadora de gonadotropinas (Cho y col., 2001), la oxitocina (Richard y Zingg, 1991) y de la neurogranina o RC3 (Íñiguez y col.,





1994). En muchos de estos casos, se ha encontrado que dichos efectos están mediados a través de RARE funcionales en el promotor de los genes, mientras que en otros casos la regulación puede ocurrir de una manera indirecta a través de enzimas implicadas en la síntesis y maduración de esas moléculas y proteínas (Lane y Bailey, 2005). Además, la funcionalidad o no de los elementos de respuesta parece depender del tejido ya que, por ejemplo, mientras que el gen de la oxitocina está regulado vía RARE en el útero, se ha demostrado que en neuronas hipotalámicas este elemento no está activo (Larcher y col., 1995).

Cabe destacar que en el hipocampo<sup>2</sup>, área cerebral perteneciente al sistema límbico relacionada con la memoria y el aprendizaje, se han encontrado altas concentraciones de proteínas implicadas en el metabolismo de la VA, como la CRBP-I, ALDH, RBP, RAR y RXR. Esto apoya la teoría de que los retinoides tienen un papel fisiológico importante en estos procesos, aunque no se conocen bien ni el grado ni el modo (Zetterström y col., 1994; Wagner y col., 2002).

#### **1.4.6.6.1. Implicación de la vitamina A en el aprendizaje y la memoria**

En los últimos años, se han realizado diversos experimentos para comprobar la implicación de los retinoides en los procesos de memoria y aprendizaje. En muchos de los casos, el modelo escogido ha sido el uso de animales con estados de deficiencia de VA. Un trabajo de Chiang y col. (1998) con ratones transgénicos sin RAR $\beta$  o RXR $\gamma$ , por ejemplo, demostró que la ausencia de estos receptores provoca fallos de memoria espacial a la hora de realizar la prueba del laberinto de agua de Morris. Asimismo, Etchamendy y col. (2003) demostraron que una deficiencia de VA durante 39 semanas provoca en los ratones fallos en el aprendizaje espacial que revierten tras un tratamiento con ATTR. Por otra parte, Cocco y col. (2002) observaron que, tras una carencia de VA de 12 semanas, las ratas presentaban también una disminución en su capacidad de aprender y memorizar y que este deterioro volvía a la normalidad tras devolver la VA a la dieta durante 2 semanas.

Otro modelo utilizado para valorar la implicación de la VA en el aprendizaje y la memoria es el comparar la capacidad de los animales jóvenes para aprender con respecto a los animales viejos. Etchamendy y col. (2001) demostraron que los ratones de 21-23 meses

---

<sup>2</sup> Se ha dedicado un capítulo más adelante a explicar, de forma más detallada, el funcionamiento y anatomía del hipocampo.





de edad presentan un déficit cognitivo con respecto a los de 4-5 meses y que este déficit puede revertirse con un tratamiento de AR. También comprobaron que el uso de un antagonista de los RAR, el CD3106, bloqueaba esta reversión, demostrando así que los retinoides estaban implicados, al menos en parte, en el déficit cognitivo asociado a la edad.

#### **1.4.6.6.2. Implicación de la vitamina A en la plasticidad sináptica**

En los terminales sinápticos se producen cambios fisiológicos duraderos dependientes de su actividad que se piensa que constituyen la base molecular y celular para el aprendizaje y la memoria. Estos procesos, denominados Potenciaciones y depresiones a largo plazo (LTP y LTD, por sus siglas en inglés) consisten, respectivamente, en aumentos y disminuciones de la respuesta postsináptica que pueden durar desde unas pocas horas hasta hacerse permanentes (Bliss y Lømo, 1973; Douglas y Goddard, 1975; Bliss y Collingridge, 1993).

En los últimos años, se han realizado numerosas investigaciones para profundizar en el modo en que la VA regula la actividad del SNC. Relacionando un poco con el experimento de antes pero profundizando en este aspecto, Chiang y col. (1998) demostraron que los ratones transgénicos sin RAR $\beta$  o RXR $\gamma$  presentaban fallos en las LTP y LTD hipocampales. Aunque el hipocampo no suele expresar el RAR $\beta$  de manera natural (Tabla 1), los fallos observados sugieren que este receptor ejerce algún tipo de regulación indirecta en la función sináptica.

La importancia de la señalización por retinoides en la plasticidad sináptica del SNC adulto se pone de relevancia en los trabajos realizados mediante deficiencia de VA experimental. Misner y col (2001), por ejemplo, observaron que tras un periodo de 12 semanas de carencia de VA, tanto las LTP como las LTD disminuían en el cerebro de ratones adultos y, tras 15 semanas de deficiencia, las LTP desaparecían por completo. Estos efectos revertían tras la readministración de VA en la dieta, lo que demuestra la participación de esta vitamina en la regulación de dichos procesos. En la misma línea de investigación, se ha comprobado que las LTP disminuyen con la edad y que esta pérdida de respuesta se reestablece parcialmente con un tratamiento de AR (Etchamendy y col., 2001) lo que sugiere que el sistema de retinoides podría estar implicado en los procesos de neurodegeneración asociados a la senectud.

Aunque el modo exacto en que los retinoides modulan la plasticidad sináptica no se conoce, se ha descubierto que los ratones sometidos a una deficiencia de VA presentan una



expresión disminuida de RAR $\beta$  y RXR $\beta/\gamma$  que es reversible con un tratamiento de ATTR (Etchamendy y col., 2003). Por otro lado, se sabe que la expresión de la neurogranina/RC3, una proteína que está implicada en la plasticidad sináptica también disminuye con la falta de VA y se reestablece con ATTR *in vitro* (Iñiguez y col., 1994). Estos dos procesos podrían estar relacionados en algunas especies y, sumado al hecho de que el ATTR parece modular también la expresión de algunos receptores de glutamato ionotrópicos (Bain y col., 1996; Beczkowska y col., 1996), podrían explicar, al menos en parte, la modulación de la plasticidad sináptica a través de los retinoides (Lane y Bailey, 2005).

#### **1.4.6.6.3. Implicación de la vitamina A en la neurogénesis**

Se ha demostrado que los retinoides juegan un papel importante en la regulación de la diferenciación neuronal durante el desarrollo embrionario (Maden, 2002) por lo que parece lógico pensar que también tienen un papel en la neurogénesis del SNC adulto. Este efecto, que consiste en la proliferación de nuevas neuronas que se integran funcionalmente entre las ya existentes, se ha estudiado mucho en el hipocampo y se piensa que, junto con las LTP y LTD, podría ser la base celular del aprendizaje y la memoria (Giap y col., 2000; Kempermann y col., 2004).

El hipocampo adulto contiene una gran cantidad de células madre en la zona subgranular. Se ha comprobado que estas células tienen capacidad para generar, *in vitro*, células gliales y neuronas (Palmer y col., 1997). El ATTR favorece, por un lado, la capacidad de estas células madre para diferenciarse en un fenotipo neuronal y, por otro, induce la expresión de determinados factores de crecimiento neuronales, como la neurotrofina 3, que permiten que este proceso se complete con éxito (Takahashi y col., 1999).

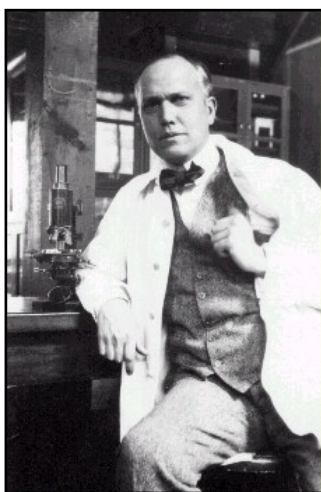
Por otro lado se ha visto que determinados retinoides también pueden inhibir la neurogénesis. Esto sugiere que o bien la concentración de VA o bien el tipo de isómero podrían resultar cruciales a la hora de fomentar o disminuir la capacidad del hipocampo para generar nuevas neuronas. En este aspecto hay que destacar el ácido 13-*cis*-retinoico, principio activo del *Accutane*, del que se ha comprobado que inhibe la neurogénesis y produce, en los ratones, fallos en el aprendizaje y la memoria (Crandall y col., 2004; Sakai y col., 2004).



## 1.5. LA VITAMINA E

### 1.5.1. Descubrimiento de la vitamina E

A principios de la década de 1920, en la Universidad de Rochester, el Profesor Henry A. Mattill y su ayudante Ruth E. Conklin realizaron una serie de investigaciones nutricionales para averiguar si la leche podría servir como alimento único durante toda la vida o, por el contrario, carecía de algún elemento necesario para el desarrollo normal de las funciones fisiológicas (Mattill y Conklin, 1920). Para ello, alimentaron a grupos de ratas con una dieta exclusiva de leche fresca y encontraron que, si bien el crecimiento era normal al inicio, a partir del día 50, el crecimiento disminuía y las hembras no eran capaces de reproducirse. Obtuvieron resultados similares sustituyendo la leche fresca por leche en polvo comercial y añadiendo a ésta un 10% de mantequilla, e incluso, probando distintas concentraciones de leche en polvo, almidón, manteca y sales minerales (Mattill y Stone, 1923). Así, concluyeron que la leche podría contener algún elemento desconocido que era capaz de inhibir la reproducción.



**Herbert McLean Evans**  
(1882-1971)

De manera paralela, Herbert M. Evans y Katharine S. Bishop realizaron una investigación similar en la Universidad de California inspirada en los recientes descubrimientos de las vitaminas A, B y C, y postularon que la reproducción podría requerir de un nutriente adicional pero no esencial para el crecimiento (Evans y Long, 1922; Evans, 1962; Wolf, 2005). Para demostrarlo analizaron las propiedades de una dieta compuesta por caseína, almidón de maíz, manteca, mantequilla, sales minerales, vitamina A en forma de aceite de hígado de cordero, vitamina B en forma de levadura y vitamina C en forma de zumo de naranja. Las ratas alimentadas con esta dieta fueron incapaces de reproducirse y, además, un análisis de su sistema reproductor determinó que, en el caso de las hembras, aunque los ovarios, la ovulación y la implantación eran funcionales, existía una disfunción a nivel de la placenta. En los machos, el epitelio seminífero se encontraba totalmente atrofiado. La incorporación de hojas de lechuga en la dieta devolvió la capacidad reproductora a estos animales. En 1922, Evans y Bishop bautizaron “factor X” al elemento desconocido que era responsable de evitar la esterilidad (Evans y Bishop, 1922; Zingg, 2007a). Dos años más tarde, Barnett Sure, de la Universidad de Arkansas, publicó una serie



de experimentos similares en los que renombró al “factor X” como vitamina E, puesto que, en 1922, McCollum y colaboradores habían publicado ya sus trabajos en los que se describía la existencia de la vitamina D (McCollum y col., 1922).

### **1.5.2. Estructura de la vitamina E**

El término “vitamina E” (VE) engloba a una serie de ocho compuestos relacionados químicamente entre sí y agrupados en dos familias, los tocoferoles y los tocotrienoles, cuya actividad biológica es similar al isómero más abundante en la naturaleza, el RRR- $\alpha$ -tocoferol o D- $\alpha$ -tocoferol (Bjorneboe y col., 1990; Schmidt y Nikoleit, 1991; Bramley y col., 2000). La estructura química de dichos compuestos fue descubierta por Evans y col. en 1936, al cristalizar un compuesto presente en el aceite de germen de trigo que poseía las mismas propiedades biológicas que la VE. Estos investigadores llamaron al compuesto “tocoferol”, palabra que deriva de los términos griegos *tocos*, que significa “nacimiento”, y *pherein*, que significa “traer”, ya que el compuesto había demostrado sus propiedades fertilizantes en las ratas (Evans y col., 1936; Wolf., 2005). Por último, en 1937, Olcott y Emerson caracterizaron las propiedades químicas de los tocoferoles y evaluaron su capacidad antioxidante (Olcott y Emerson, 1937).

Estos compuestos se caracterizan por poseer un anillo 6-cromanol unido a una cadena lateral hidrofóbica isoprenoide con tres grupos metilo cuyas propiedades difieren en cada una de las dos familias. En los tocoferoles esta cadena está saturada y posee tres grupos metilo y tres centros quirales que, de manera natural, se encuentran en posición R; en los tocotrienoles la cadena se encuentra insaturada y posee dobles enlaces en las posiciones 3', 7' y 11' (Figura 7) (Ullrey, 1981; Bramley y col., 2000; Debier y Larondelle, 2005; Zingg, 2007a). Todos estos compuestos existen, además, en cuatro formas llamadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  y que se diferencian entre sí por el número de grupos metilo y la posición de los mismos dentro del anillo 6-cromanol (Debier y Larondelle, 2005; Zingg, 2007b).

Recientemente se han encontrado otros análogos naturales de la VE. El aceite de palma, por ejemplo, contiene pequeñas cantidades de  *$\alpha$ -tocomonoenol*, caracterizado por poseer un único doble enlace en posición 11' y algunos organismos marinos poseen un compuesto llamado “derivado marino del tocoferol” que presenta un doble enlace en el extremo de la cadena que se piensa que es el resultado de una adaptación metabólica al agua fría (Yamamoto y col., 2001; Ng y col., 2004; Zingg, 2007b). Además, en los seres vivos



puede encontrarse una forma fosforilada de VE, el fosfato de tocoferol, que puede servir como forma de almacenamiento, transporte o segundo mensajero celular (Munteanu y col., 2004; Negis y col, 2005). Al igual que la VA, la VE puede esterificarse con ácidos grasos de cadena larga formando ésteres de tocoferol (ET) o de tocotrienol (ETt) (Debier y Larondelle, 2005).

Todas las formas de VE son muy sensibles a la oxidación en mayor o menor grado, por lo que al contacto con el oxígeno atmosférico pierden sus propiedades. La luz solar, en especial la luz ultravioleta (UV), acelera el proceso de oxidación, por lo que es importante su manejo en atmósferas pobres en oxígeno y, preferiblemente, bajo luz roja (Kim y col, 2006).

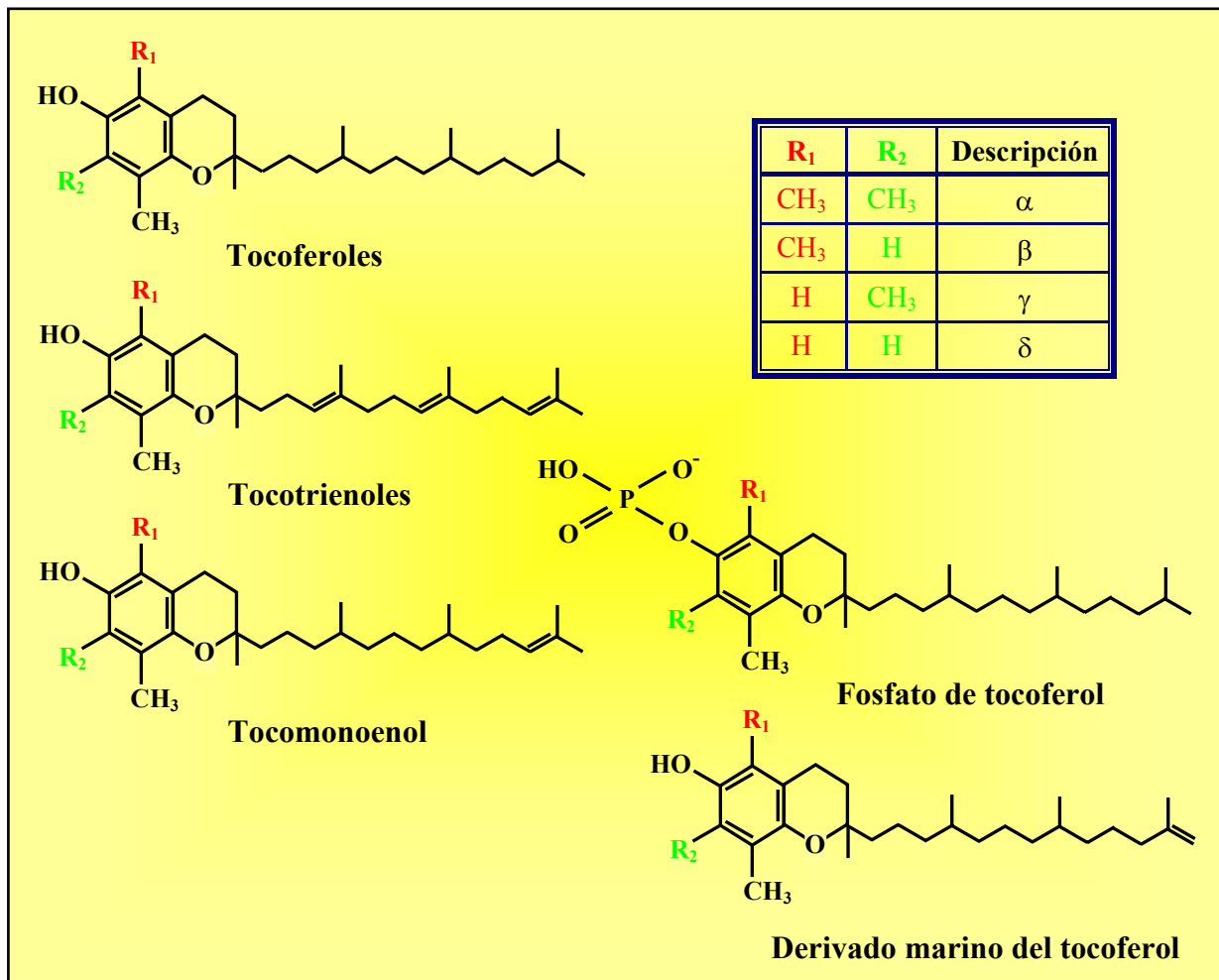


Figura 7: Análogos naturales de la vitamina E.



### **1.5.3. Necesidades diarias de vitamina E**

Actualmente se han establecido las siguientes CDR de VE (Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, 2000):

- Bebés:
  - ✓ 0-6 meses: 4 mg/día<sup>3</sup>
  - ✓ 7-12 meses: 5 mg/día
- Niños:
  - ✓ 1-3 años: 6 mg/día
  - ✓ 4-8 años: 7 mg/día
  - ✓ 9-13 años: 11 mg/día
- A partir de 14 años: 15 mg/día

Los componentes de la VE abundan en alimentos básicos como los cereales, los huevos, las leguminosas como el cacahuete, los aceites poliinsaturados de origen vegetal, en especial el de palma y el de coco, las nueces, los pescados grasos y la mayor parte de los vegetales y hortalizas de hoja verde (Debier y Larondelle, 2005).

Es muy raro encontrar casos de deficiencia de VE y, cuando se produce, se debe generalmente a problemas gástricos de absorción de grasas o enfermedades como la enfermedad celiaca o la fibrosis quística. En estos individuos, dicha deficiencia cursa con irritabilidad, anemia hemolítica, problemas motores, apatía y trastornos neurológicos.

### **1.5.4. Metabolismo de la vitamina E**

#### **1.5.4.1. Absorción**

La VE forma parte de la dieta principalmente en forma de tocoferoles libres, sobre todo RRR- $\alpha$ - y RRR- $\gamma$ - tocoferol, y ET (Traber y col., 1992; Bramley y col., 2000; Stahl y col., 2002). Una vez en el lumen intestinal, la acción de las esterasas pancreáticas y otras enzimas intestinales hidrolizan los ET y libera los tocoferoles, que penetran en los enterocitos por difusión facilitada junto con las grasas ingeridas en la dieta. Esto hace que la

---

<sup>3</sup> En ocasiones la vitamina E se expresa en UI. No obstante, dado que en este trabajo se ha fijado la dosis de tocoferol en las ratas tratadas en mg/kg, las cantidades diarias recomendadas también se han expresado así. Como referencia, 1 UI de vitamina E equivale aproximadamente a 0,67 mg de RRR- $\alpha$ -tocopherol.



cantidad y el tipo de grasas que se ingieren sean un factor clave en la correcta absorción de la VE (Bjornboe y col., 1990; Stahl y col., 2002; Debier y Larondelle, 2005) aunque, en la mayoría de los casos, una gran parte de la VE ingerida (entre un 30% y un 70%) no se absorbe y se expulsa con la heces (Bramley y col., 2000). Cabe destacar que entre las distintas formas de VE no se han encontrado diferencias significativas entre la absorción de las formas  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol, pero sí entre éstas y el resto de las especies de VE, como el  $\beta$ - y  $\delta$ -tocoferol y los tocotrienoles, que presentan una menor tasa de absorción (Traber y col., 1992; Bramley y col., 2000). Una vez en el citoplasma de los enterocitos, la VE se incorpora directamente a los quilomicrones sin necesidad de ser reesterificada y sin la intervención de proteínas transportadoras u otro tipo de metabolismo intermedio (Debier y Larondelle, 2005). Desde aquí, la VE pasa al sistema linfático y al torrente circulatorio, donde viaja principalmente hasta el hígado (Bjornboe y col., 1990; Debier y Larondelle, 2005).

Se ha observado que una dieta alta en VA conduce a una disminución en la disponibilidad de VE. Para algunos autores, esto puede ser debido a un incremento en la tasa de oxidación de los tocoferoles (Sklan y Donoghue, 1982), mientras que otros autores defienden que los retinoides pueden establecer una competición con la VE por las enzimas y otros mecanismos implicados en su entrada a los enterocitos, lo que termina desembocando en una menor tasa de absorción (Eicher y col., 1994).

#### **1.5.4.2. Transporte y almacenamiento**

Los quilomicrones, que contienen VE, pasan a la circulación general donde son progresivamente degradados por la LPL, permitiendo la liberación de pequeñas cantidades de esta vitamina que serán absorbidas por los diferentes tejidos y por los eritrocitos circulantes. No obstante, la mayor parte de la VE permanece en los quilomicrones remanentes y será por tanto retirada de la circulación por las células del parénquima hepático (Debier y Larondelle, 2005).

Una vez en el interior de los hepatocitos, los tocoferoles se unen a una proteína específica llamada proteína de transferencia de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TTP, por sus siglas en inglés) y, o bien se almacenan en el citoplasma, o bien se incorporan a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) antes de ser devueltos a la circulación general. Esta  $\alpha$ -TTP permite el movimiento del  $\alpha$ -tocoferol entre las membranas celulares y está implicada en la incorporación de la VE a las VLDL. Se ha demostrado también que la  $\alpha$ -TTP se une con una



afinidad altísima a la forma RRR- $\alpha$ -tocoferol y no al resto de las formas naturales de VE, con una afinidad comparada máxima de un 9% en el caso del  $\gamma$ -tocoferol (Traber y col., 1992; Hosomi y col., 1997; Stahl y col., 2002). Por consiguiente, mientras que el  $\alpha$ -tocoferol queda retenido en el organismo, la mayor parte de los otros tocoferoles y tocotrienoles son excretados en la bilis y eliminados. Esto explica por qué el RRR- $\alpha$ -tocoferol es la forma mayoritaria de VE en los animales (Traber y Arai, 1999; Debier y Larondelle, 2005; Zingg, 2007b).

Al contrario que en el caso de los retinoides, no existe ninguna proteína transportadora extracelular específica para la VE y, una vez que la  $\alpha$ -TTP incorpora el  $\alpha$ -tocoferol en las VLDL, éste queda libre disuelto en los lípidos (Debier y Larondelle, 2005; Zingg, 2007b). En el torrente circulatorio, las VLDL son progresivamente degradadas por la LPL y liberan una pequeña parte del  $\alpha$ -tocoferol al plasma que puede ser absorbido por los tejidos diana y por las lipoproteínas de alta densidad (HDL). No obstante, la mayor parte del  $\alpha$ -tocoferol permanece en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que se forman tras la degradación de las VLDL y es asimilado por los diferentes tejidos al adquirir las LDL a través de sus receptores específicos (Bjornboe y col., 1990; Bramley y col., 2000).

Se ha demostrado que las LDL que contienen la apolipoproteína B-100 (ApoB) pueden intercambiar  $\alpha$ -tocoferol con las HDL (Mardones y Rigotti, 2004). Esto produce que, en muchas especies, estas dos lipoproteínas sean los principales almacenes de  $\alpha$ -tocoferol circulante y actúen como principal transportador a los tejidos periféricos (Schweigert, 1990; Traber y col., 1992; Debier y Larondelle, 2005; Zingg, 2007b) (Figura 8).

#### **1.5.4.3. Transporte e incorporación de la vitamina E a los tejidos diana**

Dado que la VE es un compuesto altamente liposoluble y su principal transportador son las HDL y las LDL, su absorción por parte de los diferentes tejidos depende principalmente de las rutas metabólicas que reparten los lípidos por el organismo. El hígado o los riñones, por ejemplo, destacan por la rapidez con la que son capaces de asimilar la VE circulante mientras que, en el otro extremo, el cerebro sobresale por su baja tasa de absorción (Debier y Larondelle, 2005). En términos generales los principales almacenes de VE en el organismo son el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo (Bjornboe y col., 1990).

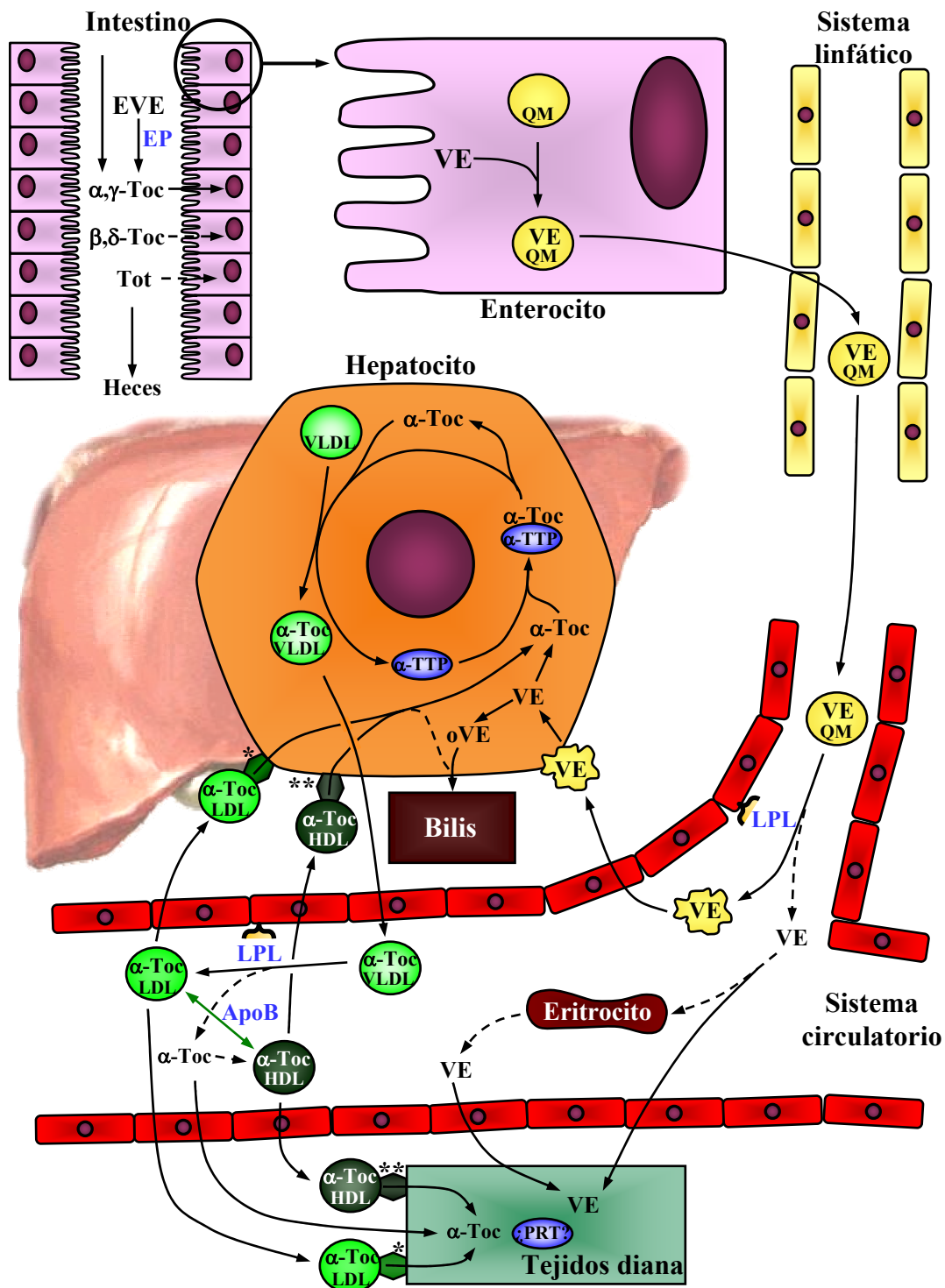
Entre los mecanismos moleculares que facilitan la incorporación de la VE a los tejidos periféricos destacan la LPL y los receptores de lipoproteínas, en especial, el receptor





de LDL y el receptor limpiador de tipo B-1 (SRB-1, por sus siglas en inglés) de HDL. La LPL, como se ha visto en el apartado anterior, participa en la degradación de los quilomicrones y las VLDL, liberando al torrente circulatorio pequeñas cantidades de VE que difunden a las células y a las HDL (Granot y col., 1988). Su acción sobre los quilomicrones explica la presencia de pequeñas cantidades de otras formas de VE en los tejidos, ya que, como se ha visto anteriormente, debido al filtro que supone la  $\alpha$ -TTP en el hígado, las lipoproteínas contienen esencialmente RRR- $\alpha$ -tocoferol (Stahl y col., 2002). En 1985, Traber y col. demostraron *in vitro* que la acción de la LPL en la superficie del endotelio vascular facilita la incorporación de  $\alpha$ -tocoferol a las células al observar que, durante la hidrólisis de los triglicéridos que forman parte de las lipoproteínas, el tocoferol pasa masivamente al citoplasma de las células que expresan la LPL (Traber y col., 1985). Sin embargo, también se ha comprobado que la presencia de la LPL facilita la absorción de tocoferol a partir de las HDL, que son pobres en triglicéridos, por lo que actualmente se piensa que, a nivel del metabolismo de la VE, esta enzima favorece la asimilación del tocoferol haciendo de “puente” entre las lipoproteínas y las células (Mardones y Rigotti, 2004) y resulta fundamental en los tejidos que expresan LPL, como la piel, el tejido adiposo y el músculo (Bramley y col., 2000; Debier y Larondelle, 2005).

El  $\alpha$ -tocoferol puede también transferirse a los tejidos por un mecanismo alternativo dependiente de los receptores de LDL y HDL. En las células en las que estos receptores se expresan masivamente, como las del tejido adiposo o las del hígado, se ha visto que el tocoferol penetra en las células junto con las lipoproteínas, por lo que no es tan necesaria la presencia de la LPL (Traber y Kayden, 1984; Bramley y col., 2000). No obstante, algunos autores opinan que esta enzima puede servir de lugar de anclaje para las HDL y LDL, incrementando así la absorción de tocoferol, al aumentar las probabilidades de que las lipoproteínas entren en contacto con sus receptores (Debier y Larondelle, 2005). Se ha visto en un ensayo *in vitro*, por ejemplo, que las células endoteliales de los capilares cerebrales aumentan su tasa de absorción de tocoferol en LDL en presencia de la LPL, por lo que este mecanismo podría ser importante en el traspaso de la barrera hematoencefálica y la llegada de la VE al cerebro (Goti y col., 2002).



**Figura 8:** Absorción y transporte de la vitamina E. ApoB: Apolipoproteína B-100;  $\alpha$ -TTP: proteína transferente de  $\alpha$ -tocoferol; EP: ésterasas pancreáticas; EVE: ésteres de vitamina E; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; LPL: lipoproteína lipasa; oVE: otras formas de vitamina E; PRT: proteínas relacionadas con el tocoferol; QM: quilomicrones; Toc: tocoferol; Tot: tocotrienoles; VE: vitamina E; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; \*: receptor de LDL; \*\*: receptor de HDL. Las líneas discontinuas representan las rutas minoritarias.



Por otro lado, los receptores de HDL, que juegan un papel fundamental en el transporte del colesterol al hígado, resultan también muy importantes en la asimilación de la VE por los tejidos periféricos dado que, como se ha visto en el apartado anterior, estas lipoproteínas son ricas en  $\alpha$ -tocoferol. Así, las células que expresan el SRB-1, como algunos pneumocitos o las células de la barrera hematoencefálica, parecen adquirir la VE principalmente a través de estas lipoproteínas (Kolleck y col., 1999). En el hepatocito, el metabolismo de las HDL y su posterior eliminación por la bilis ofrecen una vía para la eliminación del tocoferol sobrante (Figura 7), con lo que se consigue que, pese a ser una vitamina liposoluble, no tenga grandes efectos tóxicos sobre el organismo.

Una vez en el interior celular de los tejidos extrahepáticos, el tocoferol parece unirse a una serie de proteínas transferentes llamadas *proteínas relacionadas con el tocoferol* (PRT) que favorecen el transporte intracelular de la VE. Sin embargo, estas proteínas no parecen ser específicas de los tocoferoles y se piensa que intervienen en el transporte de un gran número de moléculas lipofílicas (Azzi y col., 2002) (Figura 8). Las más conocidas son las proteínas similares a la proteína transferente de fosfatidilinositol (TAP1/2/3) y la proteína transferente de fosfolípidos (PL-TP, por sus siglas en inglés) (Zingg y Azzi, 2004).

Cabe destacar que, pese a que el tejido adiposo contiene la mayor parte de la VE del organismo, que adquiere por cualquiera de las vías expuestas anteriormente, el principal órgano regulador de la homeostasis de esta vitamina es el hígado. Debido precisamente a la falta de un sistema de transporte propio, las formas de VE que llegan a los adipocitos quedan ahí retenidas y, aparentemente, sólo se movilizan cuando lo hacen las grasas en las que se encuentran disueltas (Bjornboe y col., 1990; Bramley y col., 2000). Esto hace que se pueda inducir una deficiencia de VE en el organismo y que, sin embargo, un análisis del tejido adiposo revele niveles normales de esta vitamina.

### **1.5.5. Mecanismo de acción de la vitamina E**

La vitamina E, en especial el  $\alpha$ -tocoferol, constituye una de las primeras líneas de defensa contra el estrés oxidativo<sup>4</sup> del organismo, tanto en tejidos como en el plasma sanguíneo (Bramley y col., 2000). De hecho, la mayor parte de las investigaciones realizadas sobre esta molécula desde su descubrimiento se han centrado en estas propiedades antioxidantes y, sólo en los últimos años, se ha empezado a investigar su capacidad para

---

<sup>4</sup> Se ha dedicado el capítulo siguiente al estrés oxidativo.

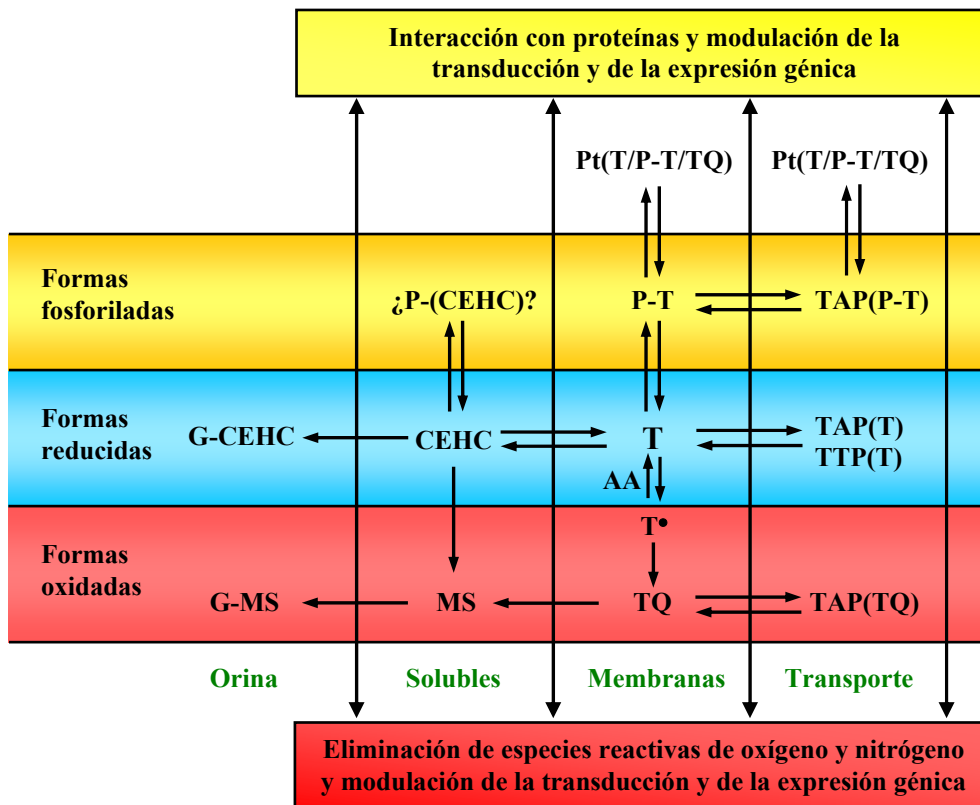


modular la actividad enzimática, los sistemas de transducción de señales y el sistema inmune (Azzi y col., 2002; Debier y Larondelle, 2005; Zingg, 2007b).

Se ha demostrado que, además de su eliminación por la bilis, tanto los tocoferoles como los tocotrienoles circulantes pueden ser metabolizados antes de su excreción para dar lugar a una serie de metabolitos secundarios que también pueden jugar un papel importante en las acciones de la VE (Brigelius-Flohé y col., 2002; Debier y Larondelle, 2005; Zingg, 2007b). Desde la década de los 50, se conocen dos derivados de los tocoferoles, llamados metabolitos de Simon (Simon y col., 1956a; 1956b), que poseen una cadena lateral más corta y el anillo cromanol abierto debido a un proceso de oxidación. El primer derivado es el ácido tocoferónico, que puede conjugarse con el ácido glucurónico para dar lugar al segundo metabolito, la tocoferonolactona (Brigelius-Flohé y col., 2002; Zingg, 2007b). Por otro lado, cuarenta años después, se descubrió la existencia de otro metabolito en la orina de animales y personas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol que se caracteriza por poseer una cadena lateral corta pero el anillo cromanol intacto (Schultz y col., 1995). Investigaciones posteriores han demostrado que esta molécula, llamada 2,5,7,8-tetrametil-2-[2'-carboxietil]hidrocromano ( $\alpha$ -CEHC), está relacionada con las funciones no-antioxidantes de la VE (Herrera y Barbas, 2001; Brigelius-Flohé y col., 2002; Debier y Larondelle, 2005; Zingg, 2007c). Un último metabolito descubierto recientemente y cuyas propiedades se están investigando es el fosfato de tocoferol. Este compuesto parece ser un potente modulador de las señales intracelulares y se cree que puede actuar a nivel de las membranas plasmáticas, aunque su verdadero papel aún se desconoce (Gills y Dennis, 2004; Zingg y Azzi, 2004; Zingg, 2007c) (Figura 9).

#### **1.5.5.1. Acciones antioxidantes de la vitamina E**

La elevada liposolubilidad de los compuestos que constituyen la VE ocasiona que su acción antioxidante sea de especial relevancia a nivel lipídico. Se ha demostrado, por ejemplo, que el  $\alpha$ -tocoferol tiene la capacidad de evitar la cascada de peroxidación que se produce en las membranas celulares al contacto con los radicales libres, al atrapar los radicales peroxilo y evitar que reaccionen con los ácidos grasos poliinsaturados. De hecho, la concentración de esta vitamina en los diferentes tejidos determina, a menudo, la susceptibilidad al daño producido por oxidantes tales como los radicales hidroxilo y peroxilo, entre otros (Cadenas y col., 1984; Reed y col., 1986).

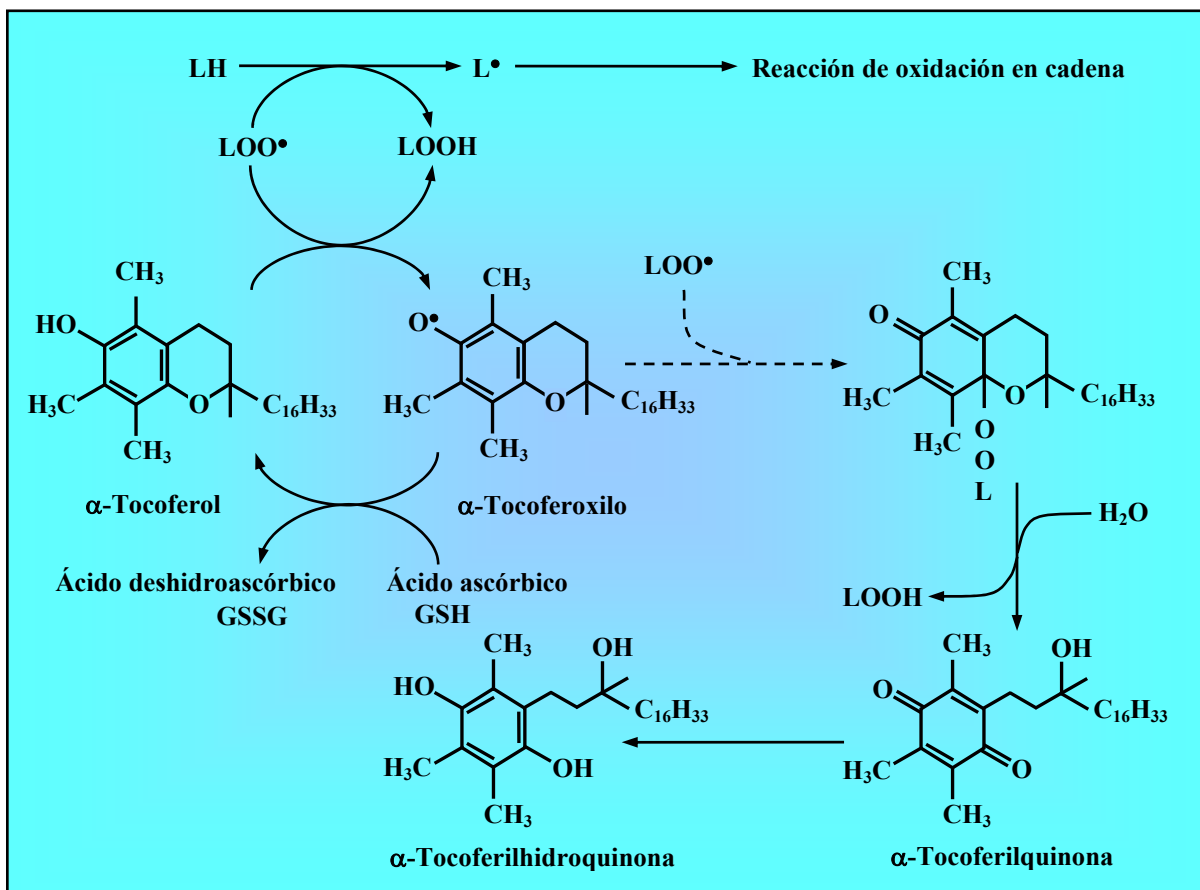


**Figura 9:** Esquema de las interconversiones e interacciones de la vitamina E (VE) y sus metabolitos. Los tocoferoles y tocotrienoles (T) se encuentran normalmente en las membranas, donde pueden ser oxidados a radicales peroxilo ( $T^{\bullet}$ ) y, o bien regenerados por medio del ácido ascórbico (AA) o bien oxidados a sus respectivas quinonas (TQ). Recientes investigaciones han demostrado que pueden ser fosforilados (P-), aunque no se sabe si esto ocurre a nivel de la membrana. Todas las formas de VE pueden interactuar con proteínas transferentes (TAP y TTP) y con proteínas involucradas directa o indirectamente en la regulación de la señalización intracelular o de la expresión génica (P y TAP). El exceso de VE es transformado en metabolitos solubles hidrocromanos (CEHC) y de Simon (MS), los cuales se conjugan con ácido glucurónico (G-CEHC y G-MS) para ser excretados por la orina. En principio, todas las formas de VE y sus metabolitos pueden modular la transducción de señales y la transcripción de manera indirecta previniendo la oxidación de proteínas gracias a su capacidad antioxidante (recuadro rojo) o bien por su interacción con otras proteínas (Pt) implicadas en la regulación de dichos procesos (recuadro amarillo). (Modificado de Zingg, 2007c).

La capacidad antioxidante de la VE reside en el anillo cromanol, cuyo grupo hidroxilo puede actuar como donador de protones para reducir y estabilizar los radicales lipídicos peroxilos. Esta reacción implica la pérdida de un átomo de hidrógeno y la transformación del tocoferol en un radical tocoferoxilo (Figura 10) y un hidroperóxido. Sin embargo, a diferencia de los ácidos grasos, este radical es estable porque el electrón desapareado del átomo de oxígeno queda deslocalizado en el anillo aromático (Debier y

Larondelle, 2005). Esta transformación se produce a una tasa constante y rápida de aproximadamente  $5 \times 10^5$  M/s, tres órdenes de magnitud por encima de la tasa de reacción de los radicales libres con los ácidos grasos, por lo que, en presencia de la VE, la reacción en cadena de peroxidación lipídica queda inhibida (Tappel, 1962; Rubbo, 2000).

Por otro lado, los radicales tocoferoxilo que se producen pueden seguir dos vías. La primera de ellas es una vía regenerativa dependiente de otros reductores celulares, como el ácido ascórbico (vitamina C) o el glutatión, que se oxidan para donar un protón al radical y transformarlo de nuevo en  $\alpha$ -tocoferol. La segunda de las vías, que es minoritaria puesto que la mayor parte de la VE se regenera, es una nueva reacción con un radical lipídico peroxilo para formar un producto de transición que finalmente se hidroliza generando un hidroperóxido y tocoferilquinona, la cual, a su vez, puede dar lugar a tocoferilhidroquinona (Debier y Larondelle, 2005; Zingg, 2007c) (Figura 10).



**Figura 10: Inhibición de la reacción en cadena de los radicales peroxilos por el tocoferol.** Una molécula lipídica (LH) reacciona con algún tipo de radical libre, en este ejemplo un radical lipídico peroxilo (LOO•), para producir un radical lipídico (L•) y un hidroperóxido (LOOH). El tocoferol reacciona con LOO• y se transforma en tocoferoxilo, mucho más estable, que puede regenerarse por acción de reductores celulares o, minoritariamente, reaccionar con otro LOO• para generar tocoferilquinona y otro LOOH.



La presencia de un grupo metilo en el anillo cromanol de la VE resulta fundamental en su capacidad antioxidante y, por tanto, las formas  $\alpha$ , que poseen tres grupos metilo, son las que presentan una mayor actividad, seguidas por las formas  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (Schüep y Rettenmainer, 1984). Por otro lado, los dobles enlaces alternos en la cadena lateral otorgan a los tocotrienoles una capacidad antioxidante ligeramente mayor que la de los tocoferoles (Suzuki y col., 1993; Sen y col., 2007). Además, se ha demostrado que la cadena lateral determina la capacidad de transporte y retención de la VE dentro de las membranas plasmáticas y, por tanto, cualquier modificación a este nivel determina una pérdida considerable de su actividad biológica (Debier y Larondelle, 2005).

Debido a su capacidad antioxidante, la VE juega un papel importante en retrasar y atenuar los síntomas de enfermedades vasculares e inflamatorias, cataratas o trastornos neurodegenerativos y, además, tiene efectos beneficiosos en ciertos tipos de cáncer y numerosas degeneraciones tisulares que se producen con la edad (Packer, 1991; Bramley y col., 2000; Ricciarelli y col., 2002; Borek, 2004).

#### **1.5.5.2. Modulación de la transducción de señales por la vitamina E**

Aunque los compuestos que forman parte de la VE son potentes antioxidantes, se les atribuyen, además, una serie de funciones fisiológicas que no están relacionadas con esta propiedad. Estas acciones han sido objeto de estudio en los últimos años y se ha demostrado que, a este nivel, las distintas formas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) difieren en sus efectos sobre el organismo. De hecho, algunos autores opinan que la especificidad hepática para retener el  $\alpha$ -tocoferol y eliminar el resto de las formas de VE, como los tocotrienoles, que son mejores antioxidantes, es la consecuencia de una selección evolutiva basada en estas diferencias (Ricciarelli y col., 2002).

Hoy en día se piensa que muchas de las acciones de la VE tienen lugar a través de su interacción con distintas proteínas celulares y se postula que los tocoferoles y tocotrienoles, o bien sus metabolitos secundarios, podrían actuar como cofactores de determinadas enzimas y activar factores de transcripción (Azzi y col., 2002; Zingg, 2007c). Por otro lado, se ha demostrado que la VE tiene efectos directos e indirectos sobre distintos sistemas de transducción de señales intracelulares que abarcan numerosas proteína quinasas, fosfatasa y proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK), lo que le confiere un papel regulador en procesos fisiológicos que van desde el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular hasta





el mantenimiento de funciones vitales en el organismo adulto como, por ejemplo, la respuesta inmune o la reproducción. Algunas de estas acciones a nivel molecular no se comprenden bien y parecen existir diferencias a nivel tisular, por lo que algunos autores opinan que las PRT podrían mediar en estos efectos (Brigelius-Flohé y col., 2002; Ricciarelli y col., 2002; Debier y Larondelle, 2005; Zingg, 2007b; 2007c).

Se ha demostrado que el  $\alpha$ -tocoferol inhibe la PKC de forma indirecta a través de la activación de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) o calcineurina (Boscoboinik y col., 1991a; Freedman y col., 1996; Sylvester y col., 2001) y también que es capaz de unirse directamente y modular a la fosfolipasa A2 (PLA2) (Chandra y col., 2002), a la ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Abate y col., 2000) y a las lipooxigenasas (LOX) -5, -12 y -15 (Grossman y Waksman, 1984; Reddanna y col., 1985; Devaraj y Jialal, 1999), posiblemente estableciendo una competición con su sustrato natural. Por otro lado, se ha observado que la VE modifica el traslado del citosol a la membrana de numerosas proteínas, posiblemente a través de una modulación en la interacción proteína-lípido de membrana, ya sea de forma directa o indirecta modificando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Hurley y Misra 2000; Teruel y Meyer, 2000; Cho y Stahelin, 2005). Cabe destacar que, gracias a su efecto sobre la PKC, la VE es capaz de modular las acciones de la VA mediadas por receptor, ya que esta quinasa puede fosforilar al  $\text{RXR}\alpha$  e inactivarlo (Gimeno y col., 2004).

Un mecanismo alternativo de regulación indirecta de la actividad de ciertas enzimas es la interacción de la VE con los sistemas redox celulares, ya que se ha visto que, por ejemplo, algunas fosfotirosina fosfatasas (PTP, por sus siglas en inglés), como la PTP-1B, pueden modularse a través de oxidaciones y reducciones reversibles (Cunnick y col., 1998; Denu y Tanner, 1998; Lee y col., 1998; Salmeen y col., 2003). Esta vitamina, gracias a sus propiedades antioxidantes, disminuye la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO) celulares y, de ese modo, puede evitar la oxidación y activación de dichas enzimas (Barret y col., 1999; Zingg, 2007c)

Por último, se ha demostrado, mediante experimentos *in vitro*, que los CEHC son capaces también de unirse a receptores nucleares, factores de transcripción y canales iónicos de membrana, modulando su actividad (Brigelius-Flohé y Traber, 1999; Brigelius-Flohé, 2005). El  $\gamma$ -CEHC, por ejemplo, inhibe la COX-2, la síntesis de la prostaglandina E2 (PGE2) (Jiang y col., 2000; 2001) y también ha demostrado tener actividad natriurética al inhibir el canal de potasio de tipo 70pS (Murray y col., 1997). No obstante, estos metabolitos se





producen a muy baja concentración en el organismo, por lo que aún no se sabe a ciencia cierta si dicha regulación ocurre también *in vivo* (Zingg, 2007c).

En la **Tabla 3** se muestra un resumen de los efectos de la VE sobre la modulación de la transducción de señales y sus implicaciones en la fisiología celular.

**1.5.6. Funciones de la vitamina E en el organismo**

Como se ha visto en el apartado anterior, la VE y sus metabolitos tienen una doble acción en el organismo, lo que hace que jueguen un papel muy importante en numerosos procesos biológicos, ya sea a través de sus propiedades antioxidantes o gracias a su capacidad para modular las cascadas de señalización celular.

**1.5.6.1. Papel de la vitamina E en el sistema inmunitario**

Se ha demostrado empíricamente que la VE es esencial para el correcto funcionamiento del sistema inmunitario, aunque el mecanismo por el cual actúa aún se desconoce. Se ha observado, por ejemplo, que la deficiencia de VE genera trastornos

Mecanismo de acción de la vitamina E	Proteína	Efecto
<b>Modulación del traslado de enzimas a la membrana plasmática</b>	Proteína quinasa C (PKC)	↓
	Proteína quinasa B (PKB)/Akt	↓
	Diacilglicerol quinasa α (DAGα)	↑
	NADPH-oxidasa	↓
	Proteína fosfatasa 2A (PP2A/Calcineurina)	↑
	Quinasas activadas por mitógenos (MAPK)	↑/↓
<b>Competición por el sitio de unión a sustrato</b>	Fosfolipasa 2A (PLA2)	↓
	Ciclooxigenasa 2 (COX2)	↓
	Lipooxigenasas (LOX)-5,-12,-15	↓
<b>Regulación vía redox</b>	Fosfatasa de fosfoinositoltrifosfato y residuos de serina/treonina (PTEN)	↑
	PP2A/Calcineurina	↑
	Fosfotirosina fosfatasa (PTP) 1B y TC45	↑
	PKB/Akt	↑
<b>Modulación de la expresión</b>	Modulación de la actividad del proteosoma	↑/↓
	Modulación vía receptores nucleares	
	-Receptores nucleares de retinoides (RNR) -Factor nuclear κB (NF-κB)	↑/↓ ↓
<b>Otros mecanismos:</b> -Activación de enzimas alostéricas -Unión competitiva al dominio de unión a membranas	Tirosina quinasas (PTK)	↓
	PTP	↑/↓
	MAPK	↑/↓

**Tabla 3:** Posibles mecanismos de modulación de la transducción de señales por la vitamina E.



inmunitarios mientras que un suplemento de VE por encima de las CDR mejora las respuestas inmunes celular y humoral y tiene un efecto estimulador sobre el sistema inmunitario de los ancianos (Meydani y Tangerdy, 1992; Bramley y col., 2000; Knight, 2000; Mitchell y col., 2003; Debier y Larondelle, 2005). Además, se ha visto que esta vitamina es esencial para el desarrollo del sistema inmune en los recién nacidos (Peplowski y col., 1980; Rajamaran y col., 1997).

Determinadas células del sistema inmunitario, como los leucocitos, presentan niveles elevados de fosfolípidos poliinsaturados susceptibles de ser atacados y destruidos por oxidación. La VE podría ejercer una acción moduladora a este nivel, posiblemente eliminando las ERO mediante su acción antioxidante y también modulando la formación de metabolitos del ácido araquidónico, ya que se ha demostrado que ambos suprimen la respuesta inmune (Meydani y Tangerdy, 1992). Además se ha visto que el efecto estimulador sobre este sistema no puede ser explicado únicamente a través de la acción antioxidante de la VE, ya que otros antioxidantes endógenos no tienen una acción similar (Meydani y Tangerdy, 1992; Debier y Larondelle, 2005).

#### **1.5.6.2. Papel de la vitamina E en la reproducción**

La VE ha demostrado ser esencial para la reproducción de los vertebrados superiores, aunque el mecanismo por el cual resulta tan fundamental no se comprende con exactitud. En el caso de los mamíferos, se ha demostrado que, en el epitelio seminífero, las ERO conducen a una menor producción de espermatozoides y a un aumento en el número de espermatozoides aberrantes que, finalmente, producen esterilidad (Agarwal y col, 2005). La VE, gracias a sus propiedades antioxidantes, retira las ERO y devuelve la funcionalidad a este epitelio (Debier y Larondelle, 2005; Agarwal y col, 2005). Por otro lado, en las hembras, la falta de VE produce un aumento de las ERO en el endometrio y la placenta que aumenta los trastornos durante la gestación, la reabsorción fetal y las posibilidades de preeclampsia (Zingg, 2007a; Perkins, 2006; Debier, 2007). Sin embargo, algunos autores opinan que la esterilidad asociada a la deficiencia de VE no puede atribuirse únicamente a su acción antioxidante y que, probablemente, la acción moduladora de dicha vitamina sobre la transducción de señales y determinados factores de transcripción también esté implicada (Debier y Larondelle, 2005; Zingg, 2007c; Debier, 2007).



Durante la gestación de la mayoría de las especies, se ha observado que el feto contiene unos niveles de VE muy bajos aunque la madre esté tomando una dieta enriquecida en esta vitamina (Sinha y Chiswick, 1992; Léger y col., 1998), posiblemente debido a una baja tasa de transferencia de lípidos plasmáticos a través de la placenta (Pazak y Scholz, 1996). A medida que el desarrollo embrionario avanza, los niveles de VE aumentan progresivamente, aunque siempre se mantienen bastante bajos, lo que hace que el recién nacido esté especialmente desprotegido ante el estrés oxidativo (Jain, 1989; Inanami y col., 1999), un hecho que queda reflejado en los altos niveles de tocoferilhidroquinona que presentan en la orina (Jain y col., 1996). La membrana de los eritrocitos en un neonato, por ejemplo, es particularmente sensible a la oxidación y, en casos de carencia de VE, la falta de defensas antioxidantes favorece la aparición de una anemia hemolítica (Jain, 1989; Inanami y col., 1999). Por consiguiente, la ingesta del calostro, con altos contenidos de VE, es fundamental en esta etapa, ya que va a proteger al recién nacido y, además, va a contribuir al correcto desarrollo de su sistema inmunitario (Stowe, 1982; Pazak y Scholz, 1996; Debier y Larondelle, 2005). De hecho, los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en la madre caen drásticamente durante la lactancia, como prueba de la transferencia que se produce a través de la leche materna y el calostro (Lauridsen y col., 2002), aunque el mecanismo exacto que permite este traspaso desde la sangre no se conoce con exactitud (Schweigert, 1990; Debier y Larondelle, 2005).

### **1.5.6.3. Papel de la vitamina E en el sistema nervioso central**

Recientes investigaciones en el campo de la nutrición clínica y de la neurociencia han demostrado que la VE tiene un papel fundamental a la hora de mantener la estructura y la función del SNC. Diversas patologías que van desde retinopatías y otros trastornos de la visión hasta encefalopatías y trastornos neuromusculares se han asociado a un déficit de esta vitamina (Brigelius-Flohé y col., 2002; Ricciarelli y col., 2002).

Clínicamente, la deficiencia de VE se puede producir por un déficit en la absorción de grasas en el intestino provocado por enfermedades como la abetalipoproteinemia o la colestasis, o bien por un trastorno primario en el metabolismo hepático de la vitamina, llamado “síndrome aislado de deficiencia de vitamina E” (SADVE), que normalmente conlleva una disminución en la  $\alpha$ -TTP y, por tanto, un aumento significativo en su eliminación a través de la bilis (Sokol, 1988; Brigelius-Flohé y col., 2002; Butterfield, 2002).



Todas estas patologías llevan asociadas una serie de trastornos neurológicos que demuestran la importancia de los tocoferoles y tocotrienoles en el SNC (Tabla 4). Por otro lado, existen diversas enfermedades neurodegenerativas, cuya aparición se incrementa con la edad, y que suponen una pérdida de las capacidades cognitivas en las que se ha demostrado la implicación de las ERO, alterando los sistemas de transducción de señales y aumentando la muerte neuronal de determinadas poblaciones de neuronas (Palmer y Paulson, 1997). Los suplementos de antioxidantes como la VE han demostrado ser efectivos en el tratamiento de estos desórdenes cognitivos asociados a la edad y en mejorar las capacidades cognitivas en los animales de laboratorio (Monji y col., 1994; Socci y col., 1995), mejorando las tasas de adquisición en pruebas de memoria y aprendizaje como el laberinto de agua de Morris y disminuyendo considerablemente el estrés oxidativo en las áreas cerebrales estudiadas (Pillai y col., 1993; Zhang y col., 1993; Socci y col., 1995; Joseph y col., 1998).

A nivel molecular, se ha demostrado una participación directa de la VE y sus metabolitos en los mecanismos de aprendizaje y memoria. El fosfato de tocoferol, por ejemplo, mejora las LTP en neuronas de la región CA1 del hipocampo<sup>5</sup> (Xie y Sastry, 1993) mientras que una falta de VE las disminuye (Xie y Sastry, 1995). Posiblemente, la

<i>Trastornos que generan una falta de vitamina E circulante</i>				
<i>Trastornos neurológicos</i>	<i>Abetalipoproteinemia</i>	<i>Colestasis crónica</i>	<i>Otros trastornos de absorción de grasas</i>	<i>Síndrome aislado de deficiencia de Vitamina E</i>
Ataxias cerebelosas	++	++	++	++
Pérdida de equilibrio	++	++	++	±
Insensibilidad al dolor	+	±	+	-
Oftalmoplejia	+	+	+	-
Ptosis	+	+	±	-
Debilidad muscular	+	+	+	+
Retinopatía pigmentaria	++	±	+	-
Disartria	+	±	+	±

**Tabla 4:** Trastornos neurológicos asociados a una deficiencia de vitamina E: ++ siempre presente; + presente en ocasiones; ± raramente presente; - no presente (Sokol, 1988).

<sup>5</sup> Se ha dedicado un capítulo más adelante a explicar, de forma más detallada, el funcionamiento y anatomía del hipocampo.



implicación del tocoferol en este proceso sea, de nuevo, a dos niveles, mejorando la estabilidad de las membranas mediante la eliminación de las ERO y evitando así los procesos de peroxidación lipídica por un lado y, por otro lado, modulando la actividad de proteínas como la PKC o la calcineurina, implicadas en la formación de las LTP (Xie y Sastry, 1993; 1995; Ferri y col., 2006; Barco y col., 2006; Citri y Malenka, 2008). Además, a nivel celular, se ha visto que el  $\alpha$ -tocoferol modula la plasticidad sináptica en la región hipocampal del giro dentado, incrementando la forma polisialilada de la molécula de adhesión celular neuronal (PSA-NCAM, por sus siglas en inglés) (Ferri y col., 2006), que está implicada en procesos de remodelado celular y reorganización sináptica (Doherty y col., 1990; Zhang y col., 1992; Seki y Rutishauser, 1998; Hu, 2000). Dicha modulación se realiza, probablemente, a través de la capacidad de la VE de inhibir la PKC, en concreto la forma  $\delta$ , puesto que se ha visto que una disminución en los niveles de esta enzima está relacionada con un aumento en la PSA-NCAM, que se produce en los procesos de desarrollo dendrítico, tanto *in vivo* como *in vitro* (Gundlfinger y col., 2003; Ferri y col., 2006). Por otro lado, se han publicado trabajos que han demostrado la implicación del  $\alpha$ -tocoferol en la neurogénesis y la supervivencia neuronal. Así, se ha encontrado que este compuesto inhibe la capacidad proliferativa de las células precursoras de las neuronas pero, al mismo tiempo, aumenta la supervivencia y disminuye la apoptosis de las neuronas preexistentes (Ciaroni y col., 1999; Cuppini y col., 2001). Aunque existen algunos trabajos que demuestran los efectos de la VE sobre la expresión de genes relacionados con estos procesos (Rota y col., 2004) (Tabla 5), el mecanismo molecular subyacente no se conoce todavía con exactitud.

#### **1.5.6.3.1. La vitamina E como molécula neuroprotectora**

Diversos trabajos han puesto de manifiesto un papel neuroprotector de la VE en diversas enfermedades neurodegenerativas cuyo origen no es un déficit vitamínico, pero que tienen un componente de estrés oxidativo en su patogenia, como son la enfermedad de Alzheimer, el mal de Parkinson, la corea de Huntington o la esclerosis múltiple (Browne y col., 1999; Butterfield y col., 2001; Butterfield y Kanski, 2001). La VE, gracias a sus propiedades antioxidantes, ha sido utilizada con fines terapéuticos en tratar los síntomas de dichas enfermedades.



Gen y función	Efecto de una DVE
<b>Factores de crecimiento</b>	
-Precursor del factor de crecimiento nervioso	↓
-Factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-I)	↓
<b>Proteínas implicadas en supervivencia neuronal</b>	
-Proteína similar a Bcl-2 11 (Bim)	↓
-Proteína reguladora de apoptosis Bax $\alpha$	↑
-Regulador de apoptosis Bcl-x	↓
<b>Neurotransmisión</b>	
-Transportador Na <sup>+</sup> dependiente de dopamina	↓
-Receptor de dopamina D3	↓
<b>Otras proteínas de señalización celular</b>	
-Subunidad reguladora $\beta$ de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K)	↑
<b>Procesamiento del péptido <math>\beta</math>-amiloide</b>	
-Proteína precursora del $\beta$ -amiloide 1	↓

**Tabla 5:** Efectos de una deficiencia de vitamina E (DVE) sobre la expresión de distintos genes implicados en procesos de diferenciación y supervivencia neuronal, neurotransmisión, señalización celular y enfermedades neurodegenerativas.

En el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, una enfermedad que se caracteriza por una pérdida cognitiva progresiva asociada a un acúmulo progresivo en el cerebro de un péptido tóxico insoluble denominado péptido  $\beta$ -amiloide, se han encontrado altos niveles de malondialdehído, un marcador de peroxidación lipídica, y bajos niveles de vitaminas C y E (Bourdel-Marchasson y col., 2001) que pueden reflejar su desgaste como antioxidante debido al estrés oxidativo al que está sometido el cerebro de estos pacientes. Un estudio clínico realizado en estos pacientes, a los que se administró un suplemento de VE solo o acompañado de vitamina C, demostró que aquellos que tomaron sólo VE aumentaron sus niveles en el LCR pero no disminuyeron los niveles de malondialdehído, mientras que aquellos que combinaron las dos vitaminas también redujeron significativamente este marcador de peroxidación lipídica, reflejando así la importancia de la VE en esta enfermedad pero también la necesidad de otros antioxidantes en el organismo para poder regenerarla (Kontush y col., 2001). Otros estudios realizados en este sentido apuntan a que los suplementos vitamínicos podrían contribuir a evitar, al menos en parte, el desarrollo de la enfermedad al evitar los trastornos neurodegenerativos asociados al elevado índice de estrés oxidativo y postulan un posible papel neuroprotector de la VE en



la enfermedad de Alzheimer (Morris y col., 1998; Butterfield y col., 2002). No obstante, esto ha sido discutido por otros autores quienes opinan que, si bien la VE protege del estrés oxidativo y, por tanto, podría ser de utilidad terapéutica en otras enfermedades como la demencia vascular, en el caso de la enfermedad de Alzheimer, al tener otros componentes patogénicos como son los acúmulos del péptido  $\beta$ -amiloide, no sería capaz de detener su desarrollo a largo plazo (Masaki y col., 2000; Butterfield y col., 2002).

Por último, en la esclerosis múltiple, una enfermedad que se caracteriza por una respuesta autoinmune y una desmielinización progresiva del SNC, la VE podría tener también un papel neuroprotector actuando a dos niveles, como antioxidante y como modulador de la señalización celular. En este sentido, se ha demostrado que los enfermos de esclerosis múltiple presentan altos niveles de malondialdehído y peróxidos lipídicos en el LCR y suero sanguíneo en comparación con el resto de la población, acompañados también por cambios significativos en la actividad de las enzimas antioxidantes de los eritrocitos, granulocitos y linfocitos (Calabrese y col., 1998). Dado que la materia blanca tiene una baja actividad antioxidante, este aumento en las ERO podría ser responsable, al menos en parte, de la desmielinización (Zhang y col., 2001), por lo que un suplemento de VE podría ayudar a disminuir el daño oxidativo a este nivel gracias a sus propiedades antioxidantes. Además, en apoyo a esta teoría, se ha demostrado que los pacientes de esclerosis múltiple tienen disminuidos los niveles de tocoferol en las placas desmielinizantes de su cerebro (Langemann y col., 1992). Por otro lado, el aumento de las ERO podría contribuir significativamente a la modificación del sistema inmunitario dado que inducen la producción de citoquinas y, de ese modo, se podría estar aumentando la respuesta autoinmune (Mehindate y col., 2001). En la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo animal de esclerosis múltiple, se ha demostrado que, en respuesta al aumento de citoquinas y de ERO, aumenta la actividad y la capacidad de unión del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, por sus siglas en inglés) al ADN (Pahan y Schmid, 2000). Dado que la VE inhibe este factor de transcripción (Hattori y col., 1995; Lee y col., 2001) y, además, elimina las ERO, podría ser utilizada como molécula neuroprotectora y reguladora de la respuesta inflamatoria en la EAE y en la esclerosis múltiple (Butterfield y col., 2002).



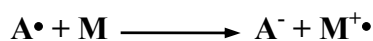
## 2. EL ESTRÉS OXIDATIVO

### 2.1. LOS RADICALES LIBRES

Un radical libre es una molécula, generalmente inestable y con una alta reactividad, que posee una configuración electrónica de capas abiertas; es decir, presenta uno o más electrones desapareados en su orbital de valencia muy susceptibles de reaccionar con otras moléculas o átomos. Se forman de manera natural en la naturaleza por la acción de las radiaciones ionizantes y también en los seres vivos como consecuencia de reacciones parciales de tipo redox (Sies, 1993; Sayre y col., 2008). Las reacciones químicas que afectan a los radicales libres se puede dividir en tres categorías llamadas: *iniciación*, *propagación* y *terminación*. Las reacciones de iniciación son aquellas en las que se generan los radicales libres. Pueden suceder cuando una molécula estable que, por ejemplo, comparte dos electrones en un enlace covalente, se rompe bajo condiciones extremas, como una temperatura muy elevada o radiaciones ionizantes, dando lugar a dos radicales separados con un electrón desapareado cada uno. Puede suceder también por la donación de un electrón a una molécula estable.



Las reacciones de propagación son aquellas en las que el número total de radicales libres no varía. En dichas reacciones, cada radical libre puede robar un electrón o un átomo de hidrógeno de otra molécula estable (M), estabilizándose a sí misma pero generando otros radicales libres que, a su vez, van a robar electrones o hidrógenos a terceras moléculas en una reacción en cadena. Este sistema de propagación cobra especial relevancia en los sistemas biológicos, ya que es el que convierte realmente a los radicales libres en compuestos perjudiciales para la vida.



Por último, dos radicales libres pueden combinarse entre sí en una reacción de terminación dando lugar a una nueva molécula estable y disminuyendo el número total de radicales libres presentes en un sistema.

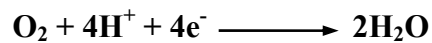




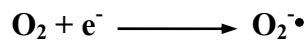


### 2.1.1. Los radicales libres en el organismo

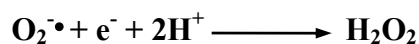
En los organismos aerobios, debido a que a su metabolismo está basado en el oxígeno, se producen continuamente radicales libres debido a la reducción de esta molécula que se produce durante la fosforilación oxidativa. En este proceso se realiza un transporte de electrones mediante una serie de reacciones redox sucesivas desde un sustrato orgánico glucídico a un aceptor final, que en este caso es el oxígeno molecular (O<sub>2</sub>). En cada uno de estos pasos los electrones se transportan mayoritariamente por pares, de manera que la reacción final del oxígeno queda de la siguiente manera:



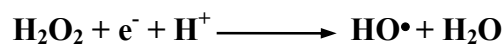
Sin embargo, en una pequeña proporción que oscila entre un 2% y un 5%, se produce un transporte de electrones de uno en uno que va a provocar la aparición de una serie de subproductos parcialmente reducidos. La primera de estas moléculas generadas es el radical superóxido (Harman, 1981; Lin y Beal, 2006; Sayre y col., 2008):



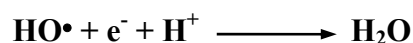
La reducción del superóxido por un nuevo electrón dará, como producto final, el peróxido de hidrógeno que, si bien no es un radical libre, presenta una alta reactividad:



Un tercer electrón transformará el peróxido de hidrógeno en una primera molécula de agua y un nuevo radical libre, el radical hidroxilo, considerado como uno de los más peligrosos ya que reacciona indiscriminadamente y daña a todas las macromoléculas como los lípidos, las proteínas o el ADN (Sayre y col., 2008):



Finalmente, el último de los cuatro electrones reducirá el radical hidroxilo a una segunda molécula de agua (Babior, 1997):

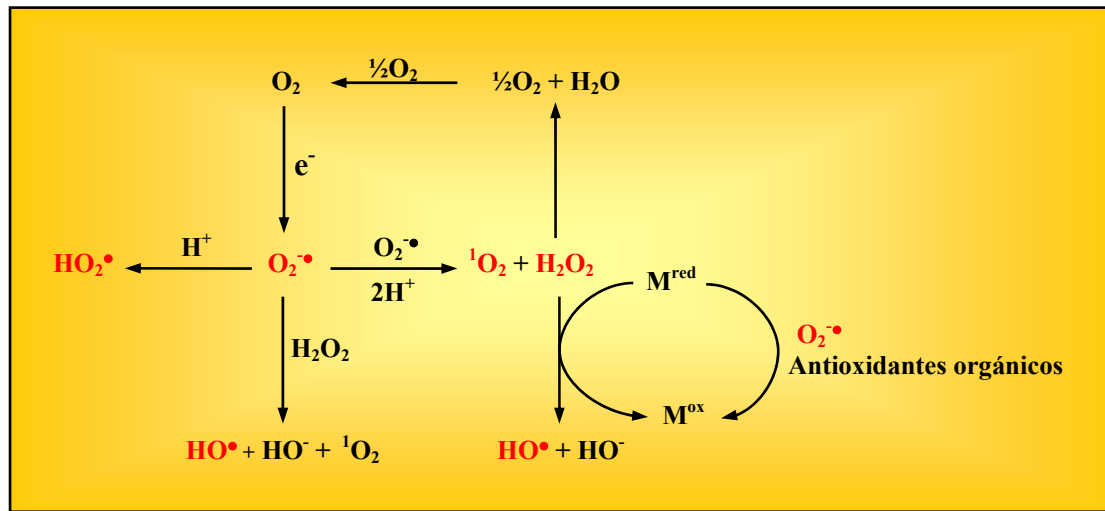




Al contrario que la mayoría de los radicales libres, el radical superóxido no posee una gran reactividad por sí mismo salvo a bajo pH, cuando existe en forma de radical hidropéroxilo ( $\text{HO}_2^\bullet$ ). Sin embargo, presenta tendencia a reaccionar consigo mismo en un proceso de dismutación espontánea para dar origen a oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). El aspecto más relevante de esta reacción es que el anión superóxido puede reaccionar de nuevo con este peróxido de hidrógeno durante la fase de propagación para dar lugar, entre otros productos, al radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ) (Sayre y col., 2008). Además de su papel como oxidante, el anión superóxido puede actuar también como reductor y ceder el electrón desapareado a metales de transición, como el hierro o el cobre, que forman parte de las metaloproteínas, y dejarlos libres en el medio en forma reducida ( $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Cu}^+$ ) (Benov, 2001; Sayre y col., 2008). Estos iones pueden entonces reaccionar con el peróxido de hidrógeno que se forma por la dismutación del superóxido para generar el radical hidroxilo y metales oxidados ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), los cuales pueden de nuevo ser reducidos por el superóxido o por antioxidantes orgánicos como el ácido ascórbico o la vitamina E, generando un ciclo de oxidación-reducción cuyo producto final es el peligroso radical hidroxilo (Sayre y col., 1999; Benov, 2001; Sayre y col., 2008) (Figura 11). La reacción del peróxido de hidrógeno con los metales de transición se denomina reacción de Fenton, en honor a su descubridor, el químico Henry J.H. Fenton (Fenton, 1894), mientras que al ciclo completo desde la formación del superóxido, se le denomina ciclo de Haber-Weiss (Haber y Weiss, 1932).

Por último, el radical superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico (NO), una molécula liberada, entre otros, por los macrófagos y la microglía en procesos inflamatorios, para originar peroxinitrito ( $\text{ONO}_2^-$ ) que, al igual que el radical hidroxilo, es capaz de dañar las macromoléculas mediante reacciones de oxidación y nitración (Álvarez y Radi, 2003).

Todas estas especies que derivan del oxígeno molecular reciben el nombre de ERO y, aunque en muchos casos pueden tener función biológica, también constituyen, junto al peroxinitrito y otras especies reactivas del nitrógeno (ERN), una base molecular importante en el envejecimiento celular y en numerosas enfermedades como el cáncer, afecciones vasculares y trastornos neurodegenerativos (Richie y col., 1996; Berlett y Stadtman, 1997; Davies, 2005; Kawabara y col., 2008).



**Figura 11: Generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) debido a una reducción parcial del oxígeno molecular para dar lugar a la aparición del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).**

La oxidación de las macromoléculas, como las proteínas, los lípidos o los ácidos nucleicos, genera subproductos que pueden cuantificarse y que indican el grado de estrés oxidativo al que está siendo sometido un tejido. Sin embargo, muchas veces un aumento en estos marcadores no sólo refleja un aumento en el estrés oxidativo sino también un trastorno a nivel de los sistemas que degradan o reparan las proteínas dañadas, como el proteosoma (Sayre y col., 2008). La oxidación de las proteínas, por ejemplo, provoca la incorporación de grupos hidroxilo en las cadenas laterales y la generación de carbonilos proteicos detectables mediante el reactivo de Brady, la 2,4-dinitrofenilhidracina. Dada la escasa difusión del radical hidroxilo por su elevada reactividad, se piensa que una gran parte del daño oxidativo a las proteínas se produce, de forma específica y local, a través de la reacción de Fenton por un aumento en los niveles de peróxido de hidrógeno que puede reaccionar con los iones metálicos de determinadas metaloproteínas (Berlett y Stadtman, 1997; Stadtman y Levine, 2003). Esta reacción puede también alterar a los ácidos nucleicos, en particular al ARN, oxidando las bases nitrogenadas y generando subproductos como la 8-hidroxiguanosina, que se puede utilizar como otro marcador de estrés oxidativo (Honda y col., 2005; Sayre y col., 2008).

Los lípidos poliinsaturados (LPI) que forman parte de las membranas celulares y las lipoproteínas son, por otro lado, las macromoléculas más sensibles a la oxidación; su reacción con un radical iniciador ( $I^{\bullet}$ ), como el radical hidroxilo, capaz de robar un hidrógeno



a un grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-), genera una reacción en cadena en las propias membranas celulares que se conoce como *peroxidación lipídica*. Esta iniciación puede ocurrir en cualquier lugar de la cadena, aunque los carbonos con hidrógenos bis-alílicos son atacados preferentemente, ya que el radical formado puede estabilizarse por resonancia (Ryan y Aust, 1992):



Una vez iniciada la reacción, comienza la fase de propagación. En primer lugar, el radical formado sufre una reacción de combinación o adición con el oxígeno molecular, formando radicales peroxilo orgánicos (ROO•). La importancia de estos radicales es su capacidad para robar un hidrógeno a un ácido graso cercano para transformarse en hidroperóxidos (ROOH). Esta reacción se propaga por las membranas celulares y puede afectar a otros componentes no lipídicos de la membrana, como las proteínas (Greco y col., 2000; Montine y col., 2004; Oliveira y col., 2007):



Finalmente, cuando uno de estos radicales reacciona con un antioxidante liposoluble, como la VE, o se combinan entre sí dos radicales lipídicos, la reacción finaliza, dando lugar a compuestos como el tocoferoxilo, no tóxico, o a aldehídos reactivos como el malondialdehído o el 4-hidroxi-2-nonenal, que son muy tóxicos ya que pueden reaccionar con las proteínas y el ADN creando enlaces covalentes entre aminoácidos y bases nitrogenadas, modificando su estructura (Sodum y Chung, 1988; Schaur, 2003; Sayre y col., 2006; 2008).

## 2.2. LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES

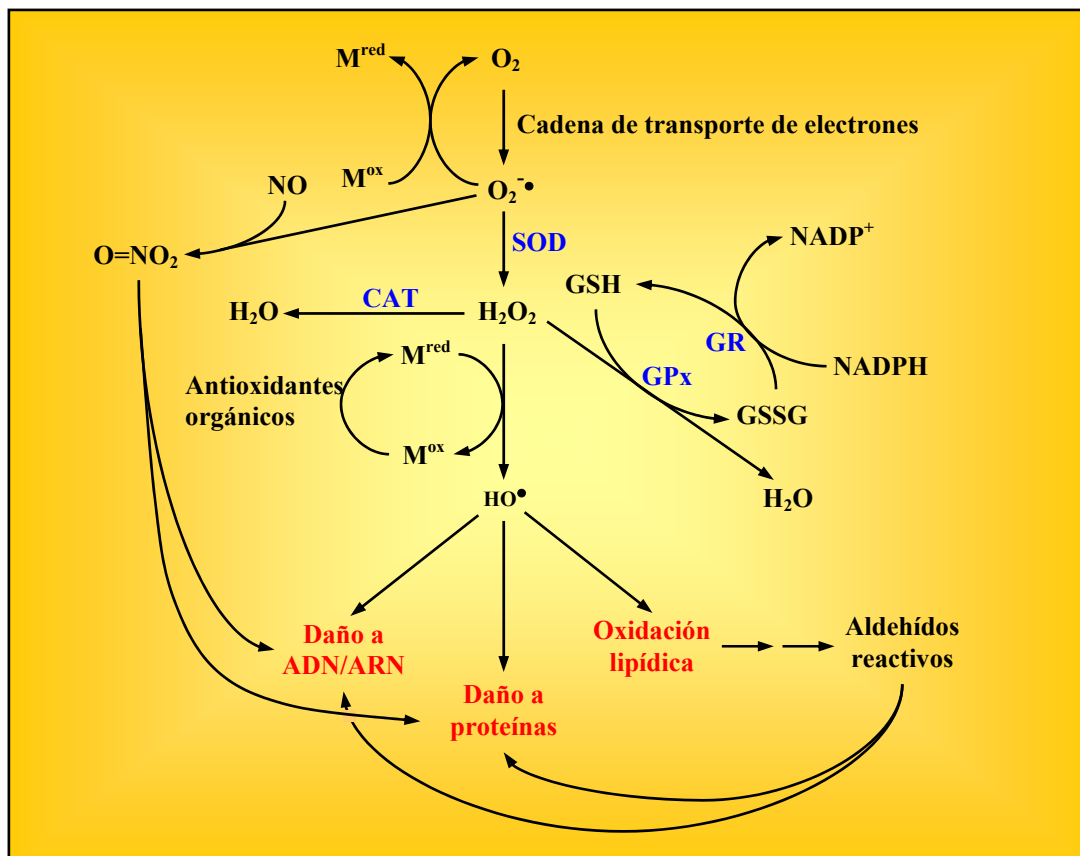
Debido a la peligrosidad de las ERO y para evitar los daños en las células y en los órganos, los organismos han desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante que pueden clasificarse en dos categorías, los sistemas enzimáticos y los sistemas no enzimáticos. Los sistemas enzimáticos están constituidos por enzimas especializadas en metabolizar las ERO y transformarlas en especies no reactivas. Entre dichas enzimas, cabe destacar la superóxido dismutasa (SOD), que transforma los aniones superóxido en peróxido



de hidrógeno, la catalasa (CAT), que transforma este peróxido de hidrógeno en agua y el sistema del glutatión (GSx). Este último lo constituye el glutatión (GSx), un tripéptido constituido por glicina, cisteína y ácido glutámico que, en su forma reducida (GSH) y por acción de la glutatión peroxidasa (GPx), pasa a la forma oxidada (GSSG) y transforma el peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua:



El segundo tipo de barrera antioxidante lo constituyen otras moléculas cuya estructura química les permite reaccionar con los radicales libres, ya sean ERO u otros radicales formados por las ERO durante la fase de propagación, y estabilizarlos, evitando así la formación de nuevos radicales. En este grupo, se incluyen principalmente a antioxidantes orgánicos como la VE o el ácido ascórbico (Figura 11).



**Figura 12:** Cadena de oxidación y sistemas antioxidantes. CAT: catalasa; GPx: glutatión peroxidasa; GR: glutatión reductasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; M<sup>ox</sup>: metales de transición oxidados; M<sup>red</sup>: metales de transición reducidos; NADP: nicotinamida adenín dinucleótido fosfato; SOD: superóxido dismutasa. Modificado de Sayre y col. (2008).



Dado que el radical hidroxilo está considerado como el instigador de la mayor parte de los daños a las macromoléculas mientras que el anión superóxido es relativamente estable, se podría pensar que la SOD es potencialmente peligrosa al transformar el superóxido en peróxido de hidrógeno, que es el precursor directo del radical hidroxilo. Sin embargo, se ha demostrado que, en ausencia de SOD, el anión superóxido se acumula y comienza a reaccionar consigo mismo para dar lugar a oxígeno singlete, con metales de transición dando pie al ciclo de Haber-Weiss y a la generación masiva del radical hidroxilo y, por último, con el óxido nítrico para generar ERN (Sayre, 2008). De hecho, la importancia de esta primera barrera antioxidante es tal que existen tres isoformas de la SOD: una isoforma citosólica que usa como cofactores iones de zinc y cobre (CuZnSOD, SOD1), una isoforma extracelular que usa también zinc y cobre (SOD3) y otra isoforma mitocondrial que usa como agente reductor el ión manganeso (MnSOD, SOD2) (Kelner y col., 1990; Yang y col., 1994; Fridovich, 1995). Todas ellas se activan por la presencia del anión superóxido y se inhiben con el producto de su reacción, es decir, el peróxido de hidrógeno. Esta reacción debe necesariamente ir acoplada a enzimas como la CAT u otras peroxidasas, como la GPx, que se distribuyen de manera ubicua en el organismo y que se activan en presencia de peróxido de hidrógeno, para eliminar de manera efectiva este compuesto y evitar la reacción de Fenton (Deisseroth y Dounce, 1970; Michiels y col., 1994; Gaetani y col., 1996). Es importante, por lo tanto, que exista un equilibrio entre las actividades de todas estas enzimas para evitar la acumulación de ERO y el desgaste del GSH y los antioxidantes no enzimáticos (Bigley y col., 1980; Meister, 1994; Michiels y col., 1994; Babior, 1997). Cuando se produce en una célula un desequilibrio entre los sistemas que generan ERO y los sistemas de defensa encargados de eliminarlas, se produce un estado conocido como *estrés oxidativo*, que se caracteriza por una acumulación progresiva de ERO y un daño cada vez mayor a las macromoléculas que, en muchos casos, termina conduciendo a la muerte celular (Harman, 1981).

### **2.3. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

El SNC es particularmente vulnerable al estrés oxidativo debido a la elevada cantidad de oxígeno que utiliza, a las bajas concentraciones de enzimas antioxidantes, al alto contenido en LPI y a las elevadas concentraciones de metales de transición redox-activos capaces de contribuir a la generación de ERO (Sayre, 2008). Todos estos factores hacen que



el estrés oxidativo sea un denominador común en numerosos trastornos degenerativos, en donde el daño neuronal puede ser un reflejo tanto del aumento en los sistemas generadores de ERO como de una disminución en las defensas antioxidantes.

En la patogenia de las enfermedades nerviosas asociadas con la edad, como la enfermedad de Alzheimer o el mal de Parkinson, y de otros trastornos como la esclerosis lateral amiotrófica o la esclerosis múltiple, existe un componente hereditario al que se suman toda una serie de factores ambientales para desarrollar la enfermedad. En todos estos trastornos se han encontrado pruebas de la existencia de estrés oxidativo neuronal, aunque se desconoce si dicho estrés sucede como consecuencia de un proceso degenerativo iniciado por otros factores, tales como defectos genéticos o si, por el contrario, el estrés oxidativo es, en sí mismo, un desencadenante principal que termina contribuyendo al desarrollo de la enfermedad.

Existen cuatro elementos principales que están implicados en el desarrollo de todos los trastornos neurodegenerativos, si bien es cierto que no tienen por qué aparecer todos a la vez. El primero de ellos es la interrelación entre un proceso neuroinflamatorio y un estrés oxidativo crónico, ya que se ha demostrado que los niveles de óxido nítrico, un segundo mensajero liberado por los macrófagos o la microglía durante una inflamación, pueden aumentar y facilitar que éste reaccione con el anión superóxido para generar peroxinitrito, que a su vez es capaz de oxidar, nitrar y dañar numerosas macromoléculas (Álvarez y Radi, 2003). Además, los productos prooxidantes generados durante este proceso son capaces de activar y aumentar la respuesta inmune, creando así un círculo vicioso de estrés oxidativo e inflamación (Floyd, 1999; Calabrese y col., 2000). Un segundo componente es la acumulación progresiva de proteínas aberrantes en las células del SNC, un suceso común en la enfermedad de Alzheimer, el mal de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la corea de Huntington (Sayre, 2008). El tercer componente, que comparten la enfermedad de Alzheimer, el mal de Parkinson y la esclerosis múltiple, es un desajuste en la homeostasis de los metales de transición, tanto redox-activos, (cobre o hierro), como inactivos, (zinc) (Sayre y col., 2006; 2008; Salazar y col., 2006; Donnelly y col., 2007). El cuarto y último denominador común en la mayoría de los trastornos neurodegenerativos es un funcionamiento anormal de las mitocondrias, que juegan un papel fundamental en el metabolismo y participan en la regulación del ciclo celular (Lin y Beal, 2006; Sayre y col., 2008). Puesto que la fosforilación oxidativa es la mayor fuente de ERO, existe una relación



indiscutible entre la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo en estas enfermedades neurodegenerativas. De hecho, en condiciones normales, la membrana interna de la mitocondria posee niveles altos de antioxidantes, tanto enzimáticos, como la SOD2, como no enzimáticos, mientras que, en condiciones patológicas, estas defensas disminuyen, ya sea por defectos genéticos o por un desgaste a causa del aumento en la producción de ERO. Aunque no se sabe a ciencia cierta si los fallos mitocondriales son la causa de la degeneración celular o son un daño colateral propiciado por algún otro agente patogénico, cada vez hay más pruebas de que el estrés oxidativo derivado de estos fallos es una causa principal implicada en la neurodegeneración (Mancuso y col., 2006). Por otro lado, este estrés oxidativo mitocondrial puede dañar los citocromos de la cadena de transporte de electrones y provocar un aumento en las ERO, cerrando un nuevo círculo vicioso que termina irremediablemente por dañar las membranas y el ADN mitocondriales.

Por último, bajo condiciones de estrés oxidativo y dependiendo de la gravedad de los daños y de los niveles de ERO, puede suceder la muerte neuronal principalmente por dos procesos independientes llamados necrosis y apoptosis. La necrosis es un proceso pasivo, no dependiente de adenosín 5' trifosfato (ATP), que está asociado a una ruptura de la membrana plasmática y un vertido del contenido citosólico al medio extracelular, afectando a células vecinas y provocando inflamación. La apoptosis o muerte programada, por el contrario, es un proceso altamente regulado, dependiente de ATP y no inflamatorio que se caracteriza por la fragmentación del ADN, la condensación y desensamblaje del núcleo de la célula y la reducción de ésta a pequeños fragmentos llamados cuerpos apoptóticos rodeados de una membrana plasmática intacta. Existen dos rutas principales que conducen a la muerte por apoptosis, una extrínseca, que se inicia por la unión de ciertos ligandos a receptores de la membrana plasmática y otra intrínseca, iniciada a nivel mitocondrial con la formación de poros en la membrana a través de los que liberan al citosol factores, como el citocromo C, que inician el proceso de muerte celular (Miller, 1998; Aoki y col., 2002; Kerr, 2002). La apoptosis posee un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio muerte-proliferación celulares y, mientras que una disminución en los procesos pro-apoptóticos puede dar lugar a la aparición de tumores, un aumento conduce al envejecimiento prematuro de los tejidos y, en el caso del SNC, a la aparición de trastornos neurodegenerativos (Krantic y col., 2005; Reeve y col., 2008; Vila y col., 2008).



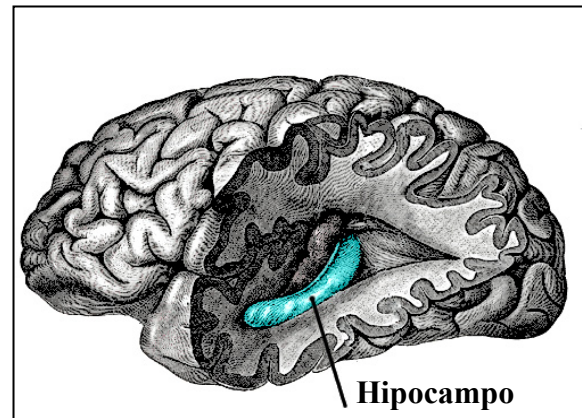


### 3. EL HIPOCAMPO

El hipocampo es un área del cerebro situada en la base interna del lóbulo temporal. Constituye la mayor parte de lo que se conoce como *arquicorteza* y se le considera una de las formaciones más antiguas y conservadas del cerebro de los vertebrados superiores (McLean, 1958). El hipocampo está relacionado con los procesos de aprendizaje, memoria a corto plazo y memoria espacial y, junto con el tálamo, el hipotálamo, la amígdala, el cuerpo calloso, el área septal, la hipófisis y el mesencéfalo, forma el sistema límbico (McEwen, 1996; Aboitiz y col., 2003).

#### 3.1. ANATOMÍA DEL HIPOCAMPO

El hipocampo es una formación doble que se origina durante el desarrollo embrionario a partir de una invaginación de la corteza. Aunque al inicio se encuentra junto al tálamo, debido al posterior crecimiento de los lóbulos temporales durante la gestación, sufre una migración hasta situarse en su posición definitiva en el piso del asta inferior de los ventrículos laterales (Figura 13) (McLean, 1958; Giap y col., 2000).



**Figura 13:** Localización del hipocampo en el cerebro humano.

Existen tres partes o campos diferenciados dentro de esta formación que son: el cuerno de Ammon (CA), el subículo y el giro dentado (GD). Algunos autores reservan el nombre de hipocampo para el CA y llaman a todo el conjunto *formación hipocampal*, mientras que otros, incluyen también en ella a la corteza entorrinal (CE) (Martin, 1989; Giap y col., 2000; Purves, 2006). Esto hace que exista cierta controversia y confusión a la hora de hablar de esta parte del cerebro. Para simplificar, en este trabajo se emplea el término hipocampo para hacer referencia al conjunto de CA, subículo y GD, puesto que macroscópicamente, es difícil diferenciarlas en el cerebro de la rata.

El CA se llama así por su semejanza con los cuernos de un carnero; es la parte mayoritaria del hipocampo y se compone, a su vez, de cuatro zonas llamadas CA1-CA4, siendo esta última zona también conocida como *hilus*. No obstante, muchos autores



consideran al CA4/*hilus* como una parte del GD y, por tanto, dividen el CA en CA1-CA3 (Amaral y col., 2007; Arushanyan y Beier, 2008).

Todas las áreas del hipocampo se componen, a su vez, de tres capas o estratos distinguibles al microscopio. En el caso del CA y del subículo estas capas son: la capa polimórfica, el estrato piramidal y el estrato molecular; en el GD son: el estrato polimórfico, el estrato granuloso y el estrato molecular, también llamado *Fascia dentata* por algunos autores (Martin, 1989).

En el CA, la capa polimórfica puede subdividirse en: *Alveus* y *Stratum oriens* (StO). El *Alveus* es la capa más superficial y contiene los axones de las células piramidales, mientras que el StO está constituido por multitud de interneuronas y células en canasta inhibitorias que juegan un papel fundamental en los procesos de memoria y aprendizaje. El estrato piramidal, por otra parte, está constituido principalmente por los somas de las células piramidales y algunas interneuronas, mientras que el estrato molecular se subdivide, a su vez, en cuatro subestratos: *Stratum lucidum* (StLu), *Stratum radiatum* (StR), *Stratum lacunosum* (StLa) y *Stratum moleculare* (StMo). El StLu es extremadamente delgado y está compuesto principalmente por las fibras musgosas que parten de las células granulares del GD. El StR contiene unas fibras llamadas *fibras colaterales de Schaffer*, que comunican el CA1 con el CA3, y algunas interneuronas. El StLa es muy delgado y contiene tanto *fibras colaterales de Schaffer* como otras fibras provenientes de la corteza entorrinal que constituyen la *vía perforante*. Finalmente, el StMo está constituido por las dendritas apicales de las células piramidales y sus sinapsis. Debido a que estos dos últimos subestratos son muy delgados, se les suele agrupar en un *Stratum lacunosum-moleculare* (Andersen y col., 1971; Amaral y Witter, 1989; Giap y col., 2000) (Figura 14).

En el GD, la capa polimórfica la constituye el *hilus/CA4* y está compuesta por multitud de interneuronas y los axones de las células granulosas que van desde el estrato granuloso hasta el CA3. El estrato granuloso lo constituyen los somas de las células granulosas, que son las principales neuronas del GD. Finalmente, el estrato molecular se subdivide en *Stratum moleculare* interno (StMo int) y *Stratum moleculare* externo (StMo ext). El primero de ellos está compuesto por las vías aferentes de otras áreas cerebrales que realizan sinapsis en las proximidades de las células granulosas, mientras que el segundo es la capa más alejada de la capa granulosa y está compuesta por las dendritas apicales de las células granulosas, que realizan a este nivel sinapsis excitatorias con las fibras

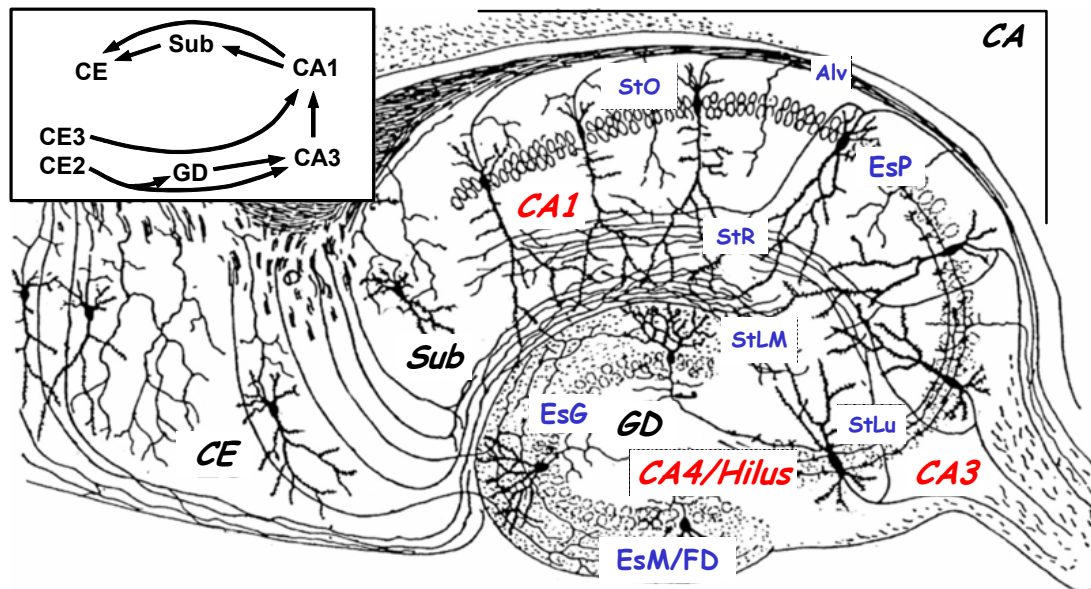


de la *vía perforante* que discurren a través de este substrato (Andersen y col., 1971; Giap y col., 2000; Amaral y col., 2007) (Figura 14).

### 3.2. BASE FUNCIONAL

Se ha demostrado, a partir de casos clínicos y experimentales en los que el hipocampo ha resultado dañado o extirpado, que esta formación es fundamental en los procesos de aprendizaje y memoria (Giap y col., 2000). Se han descrito, por ejemplo, casos clínicos de personas que sufrieron crisis hipotensivas durante una operación que les causaron daños en el área CA1 a causa de los cuales desarrollaron episodios de amnesia anterógrada (Zola-Morgan y col., 1986). También se ha comprobado que una supresión del receptor de N-metil D-aspartato (NMDA) en las células piramidales del área CA1 en ratones produce fallos en la memoria espacial (Tsien y col., 1996).

Esta área parece actuar como un “almacén temporal” donde se guardan las experiencias sensoriales, durante un periodo corto de tiempo, antes de ser integradas por



**Figura 14:** Estructura microscópica del hipocampo de la rata y principales circuitos neuronales. Alv: *Alveus*; CA: *Cuerno de Ammon*; CE: *Corteza entorrinal*; EsM: *Estrato molecular*; EsG: *Estrato granuloso*; EsP: *Estrato piramidal*; FD: *Fascia dentata*; GD: *Giro dentado*; StLM: *Stratum lacunosum-moleculare*, StLu: *Stratum lucidum*; StO: *Stratum oriens*; StR: *Stratum radialis*; Sub: *Subículo*. Tomado y modificado de Ramón y Cajal (1911).



otras áreas cerebrales como la corteza, resultando por tanto, fundamental, para la adquisición de nuevos recuerdos (Giap y col., 2000). De los distintos tipos de memoria que existen, tales como la memoria explícita (declarativa) e implícita (de procedimiento), o la memoria reciente y remota, el hipocampo parece estar implicado principalmente en los procesos que consolidan las memorias declarativa y reciente (Tulving y Markowitsch, 1998). Así, participa, por un lado, en la formación de las memorias relacionadas con hechos que se recuerdan mediante un esfuerzo consciente y deliberado, tales como los acontecimientos sucedidos en días anteriores o los conocimientos adquiridos a través del aprendizaje; y, por otro lado, dada su capacidad para servir de “almacén temporal” antes de la formación e integración de los recuerdos definitivos por la corteza cerebral, en el recuerdo de aquellos sucesos acontecidos en el pasado más inmediato (Giap y col., 2000).

### **3.2.1. Circuitos neuronales en el hipocampo**

La principal vía aferente al hipocampo recibe el nombre de *vía perforante* y está constituida por multitud de axones que parten de la CE, cuyas neuronas realizan sinapsis a su vez con axones provenientes de otras partes del cerebro como la corteza o el *fornix*. Dentro del hipocampo, los axones de la *vía perforante* llegan hasta el estrato granuloso del GD, donde realizan sinapsis con las células granulosas, o bien se extienden hasta el StLa, estableciendo sinapsis con las células piramidales del CA1 y CA3 (Shapiro, 2001; Amaral y col., 2007). A su vez, los axones de las células granulosas, que reciben el nombre de *fibras musgosas*, atraviesan el CA4/*hilus* y llegan hasta el campo CA3 a través del SrLu, donde realizan sinapsis con las células piramidales. Las neuronas de este campo envían sus axones, que reciben el nombre de *fibras colaterales de Schaffer*, hasta el CA1, cuyas neuronas pueden, a su vez, realizar sinapsis con las células del *subículo* (Figura 14).

La principal vía eferente del hipocampo está constituida por axones del CA1 y del *subículo* que inervan la CE, desde la que parten axones de vuelta a las distintas áreas cerebrales (Amaral y Witter, 1989; Shapiro, 2001).

### **3.3. BASES NEUROLÓGICAS DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA**

Durante el desarrollo embrionario y la formación del cerebro, se hace evidente la capacidad de las neuronas para proliferar y formar circuitos neuronales. Hasta mediados de la década de los 60, se pensaba que todas las neuronas del adulto se producían durante el desarrollo embrionario y que, por tanto, a lo largo de la vida del individuo, lo único que



podía suceder en el SNC era la pérdida progresiva de neuronas debido, entre otras cosas, a la madurez y la senectud. Esta suposición, que se sigue aceptando hoy en día, está bastante alejada de la realidad. En los últimos años, se ha demostrado no sólo que las neuronas adultas conservan la capacidad de adaptarse y de modificar los circuitos existentes, sino que el SNC sigue manteniendo cierta capacidad de regeneración que le permite recuperarse tras un daño tisular (Arushanyan y Beier, 2008). Aunque el mecanismo molecular responsable no se conoce totalmente, esta capacidad adaptativa parece depender de determinados cambios, altamente regulados, que se producen en las sinapsis existentes. Las modificaciones a este nivel incluyen modificaciones de las proteínas ya existentes así como alteraciones en la expresión génica de nuevas proteínas que conducen, no sólo a la alteración de la respuesta sináptica, sino también a la formación de nuevas conexiones dendríticas y terminales axónicos. Además, el SNC conserva toda una batería de células precursoras neuronales, localizadas principalmente en el revestimiento epitelial de los ventrículos laterales y en el estrato granuloso del GD del hipocampo, que permiten la recuperación, al menos parcial, de la funcionalidad del SNC tras una lesión o enfermedad neurológica (Shapiro, 2001; Purves, 2006; Arushanyan y Beier, 2008).

Las modificaciones funcionales y estructurales que ocurren en el SNC a lo largo de la vida de un individuo a nivel de las sinapsis nerviosas, se engloban en lo que se conoce como *plasticidad neuronal* y constituye, a su vez, la base celular y molecular del aprendizaje y la memoria. Se ha demostrado la existencia de esta plasticidad neuronal a lo largo de toda la escala evolutiva animal, en aquellas especies con un sistema nervioso desarrollado. Dichos procesos han sido analizados, sobre todo, en determinados invertebrados como *Aplysia* sp. (Kandel y Tauc, 1965; Squire y Kandel, 1999; Kandel, 2005). Sin embargo, en vertebrados superiores, debido a la complejidad del SNC, estos estudios están más limitados, aunque hay indicios de que todas las sinapsis químicas son capaces de sufrir cambios plásticos (Purves, 2006). En estos organismos, los procesos que subyacen tras la plasticidad neuronal pueden clasificarse en:<sup>6</sup>

---

<sup>6</sup> Debido a la complejidad de los procesos de plasticidad sináptica, el fin de este apartado no es analizarlos en detalle ni hablar de todos los procesos que hoy en día se están postulando como base molecular de la plasticidad neuronal, sino dar al lector de este trabajo una idea general sobre los sucesos fisiológicos que se producen en el hipocampo para ayudarle a comprender su funcionamiento.



- Plasticidad sináptica a corto plazo:
  - ✓ Facilitación
  - ✓ Potenciación post-tetánica
  - ✓ Depresión sináptica
- Plasticidad sináptica a largo plazo:
  - ✓ Potenciaciones a largo plazo
  - ✓ Depresiones a largo plazo

### **3.3.1. Procesos de plasticidad sináptica a corto plazo**

La plasticidad sináptica a corto plazo engloba todos los procesos que modifican la actividad de las neuronas y cuyos efectos duran desde milisegundos hasta unos pocos minutos (Barco y col., 2006; Purves, 2006). Son mecanismos que ocurren principalmente a nivel del terminal presináptico y han sido estudiados principalmente en el sistema nervioso periférico (SNP), sobre todo en las placas motoras, aunque también se han registrado en el SNC.

#### **3.3.1.1. Facilitación**

La facilitación es un incremento en el potencial de acción postsináptico producido tras un incremento en la frecuencia de los potenciales presinápticos. Parece ocurrir por una acumulación progresiva de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma del terminal presináptico debida a la llegada de trenes de potenciales de acción por encima de la tasa de recuperación de la neurona. Este  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado favorece la exocitosis de los neurotransmisores y facilita que los siguientes potenciales que alcancen el terminal generen una respuesta postsináptica cuando, por sí solos, no serían capaces de producirla (Figura 15) (Capogna, 1998).

#### **3.3.1.2. Potenciación post-tetánica**

La potenciación post-tetánica es un proceso similar al anterior, salvo que la duración del efecto es mayor y entran en juego otros orgánulos celulares como las mitocondrias y las vesículas de núcleo denso (VND). En este proceso, el  $\text{Ca}^{2+}$  que se va acumulando progresivamente en el citoplasma, tras la llegada masiva de trenes de potenciales de acción, es absorbido por las mitocondrias, que actúan a modo de almacén. Tras el cese de la actividad presináptica masiva, el  $\text{Ca}^{2+}$  vuelve poco a poco al citoplasma desde las mitocondrias. Por un lado, este aporte extra de  $\text{Ca}^{2+}$  conduce a la célula a un estado similar al

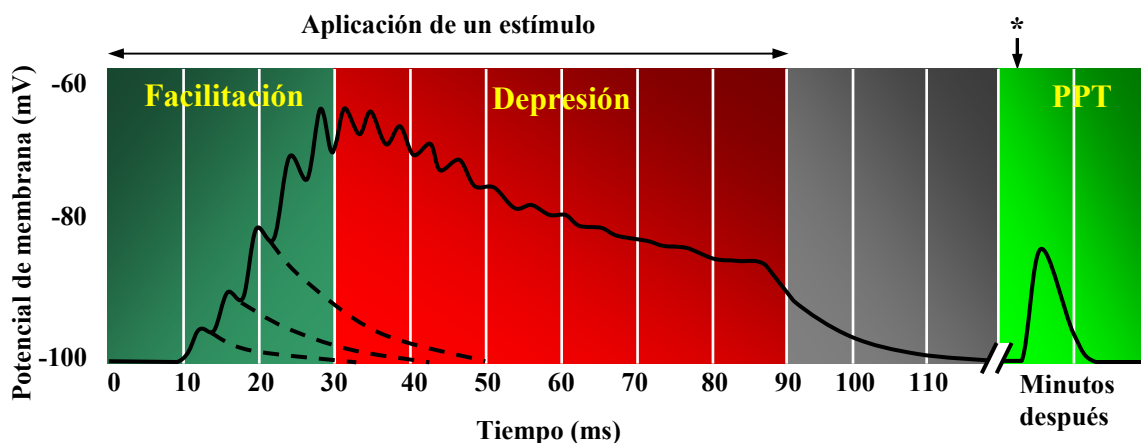




que ocurre en el proceso de facilitación, por lo que los siguientes potenciales de acción que lleguen al terminal serán capaces de provocar liberación de neurotransmisores y generar una respuesta postsináptica. Por otro lado, el  $\text{Ca}^{2+}$  favorece la fusión de las VND con la membrana plasmática y la exocitosis de su contenido, principalmente neuropéptidos que producen un cambio en la hendidura sináptica duradero en el tiempo hasta que son degradados (Figura 15) (Magleby y Zengel, 1982; Zucker y Regehr, 2002; Kandel y col, 2001; Citri y Malenka, 2008).

### 3.3.1.3. Depresión sináptica

La depresión sináptica es el proceso que le sucede a la neurona presináptica tras una llegada masiva de potenciales de acción de manera sostenida en el tiempo. La liberación masiva de neurotransmisores conduce a la célula a un lógico agotamiento de sus reservas, por lo que, llegado un punto, los potenciales de acción presinápticos no serán capaces de generar una respuesta postsináptica puesto que la cantidad de neurotransmisores liberados es mínima. Este estado es más o menos duradero en el tiempo en función de la capacidad de la neurona para reciclar los neurotransmisores liberados o sintetizarlos *de novo* (Figura 15) (Kandel y col, 2001).



**Figura 15: Procesos de plasticidad neuronal a corto plazo en una sinapsis neuromuscular.** La llegada de una sucesión de estímulos sostenida en el tiempo provoca el acúmulo progresivo de  $\text{Ca}^{2+}$  y la consiguiente facilitación hasta que, llegado un punto, el agotamiento de la neurona produce una depresión sináptica. Si la aplicación del estímulo ha sido suficiente, transcurrido un tiempo para la recuperación de la neurona, se podrá apreciar una potenciación post-tetánica (PPT) tras la aplicación de un nuevo estímulo (\*). Modificado de Kandel y col. (2001).



### **3.3.2. Procesos de plasticidad sináptica a largo plazo**

Los procesos de plasticidad sináptica a largo plazo son modificaciones del terminal sináptico duraderas en el tiempo que ocurren, generalmente, tras una estimulación prolongada de la neurona presináptica. Son mecanismos bastante complejos y altamente regulados que implican síntesis de proteínas *de novo* y pueden durar desde unos minutos hasta hacerse permanentes. Se han detectado especialmente en el hipocampo y determinadas áreas de la corteza cerebral o la amígdala (Giap y col., 2000) y, para muchos, constituyen la base del aprendizaje y la memoria a largo plazo.

Al contrario que los sistemas de plasticidad a corto plazo, estos procesos implican cambios principalmente a nivel del terminal postsináptico que van a incrementar, o disminuir, la respuesta que se genera para un mismo estímulo. Así, los procesos de plasticidad a largo plazo se pueden dividir en LTP y LTD. Distintos autores han propuesto varios sistemas que podrían estar implicados en generar este tipo de respuestas. Parece, por tanto, que los términos LTP y LTD describen dos fenómenos globales caracterizados por la modificación de la respuesta postsináptica, detrás de los cuales puede haber distintos mecanismos moleculares implicados que varían en función del tipo celular (Citri y Malenka, 2008)

#### **3.3.2.1. Potenciones a largo plazo**

Las LTP se producen, generalmente, cuando se estimula un terminal mediante un pulso de estímulos de alta frecuencia sostenido en el tiempo. Es un proceso que se ha registrado en distintas áreas del hipocampo, sobre todo en las neuronas piramidales del CA1 (Citri y Malenka, 2008).

El mecanismo de las LTP más estudiado implica dos tipos de receptores ionotrópicos de glutamato, denominados receptores de N-metil D-aspartato (NMDA) y receptores de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA). Estos receptores glutamatérgicos son ionotrópicos y se suelen coexpresar en el terminal postsináptico, aunque difieren en su forma de responder a la llegada del neurotransmisor. Así, mientras que los AMPA son canales permeables a iones monovalentes ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) capaces de abrirse tras la unión del glutamato y generar un potencial de acción, los NMDA no son capaces por sí solos de permitir la entrada de iones, ya que, en condiciones basales, su poro se encuentra bloqueado por un ión de  $\text{Mg}^{2+}$  (Kandel y col., 2001; Citri y Malenka, 2008).





Un estímulo excitatorio de la sinapsis producirá, tras la liberación de glutamato, una apertura de los receptores AMPA. Si se abre un número suficiente de dichos receptores se producirá la despolarización de la membrana por entrada de  $\text{Na}^+$  y se generará un potencial de acción. Esta despolarización tiene, además, un efecto colateral sobre los receptores NMDA, ya que al variar el voltaje de la membrana, el  $\text{Mg}^{2+}$  es expulsado del poro, permitiendo así la entrada de iones a través del receptor NMDA. A diferencia de los receptores AMPA, los NMDA permiten también la entrada simultánea de  $\text{Ca}^{2+}$ , junto con el  $\text{Na}^+$ , al interior celular (Barco y col., 2006; Berne y Levy, 2006; Purves, 2006). La entrada de  $\text{Na}^+$  a través de los receptores NMDA facilita la generación de un potencial de acción con la siguiente llegada de glutamato, por lo que produce un primer efecto potenciador sobre la sinapsis nerviosa (Barco y col., 2006). Además, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma celular tiene consecuencias duraderas que determinarán, a largo plazo, la respuesta del terminal a los estímulos que le lleguen (Figura 16). Si la estimulación es suficientemente fuerte, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  incrementará significativamente los niveles intracelulares de este ión, que se unirá a la Calmodulina (CaM). Esta CaM unida a  $\text{Ca}^{2+}$  es capaz de activar diversas enzimas dependientes de CaM, como determinadas isoformas de Adenilato Ciclasa (AC) o la quinasa dependiente de CaM II (CaMKII) (Barco y col., 2006; Citri y Malenka, 2008). La activación de la CaMKII y las consiguientes enzimas activadas por ella favorece, por un lado, la síntesis *in situ* de nuevas proteínas que van a reforzar las sinapsis existentes y, por otro lado, la fosforilación de los receptores AMPA en determinadas subunidades que origina una mejora en su capacidad de respuesta al glutamato (Lee y col., 2000). A su vez, la activación de la AC conduce a la formación de un segundo mensajero, el adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Este AMPC se une a la PKA, cuyas subunidades catalíticas, conducirán a la fosforilación de distintas proteínas, produciéndose así efectos locales a nivel de las sinapsis y efectos a nivel transcripcional. En los terminales postsinápticos, la PKA activa va a fosforilar también a los receptores AMPA y a enzimas implicadas en la síntesis de proteínas, sumándose por tanto a los efectos de la CaMKII (Lee y col., 2000; Barco y col., 2006). El transporte retrógrado de la subunidad catalítica activa de la PKA hasta el soma de la neurona provocará la activación de una ruta de MAPK que culmina en la activación de la quinasa dependiente de estímulos extracelulares (ERK). Tanto la ERK como la PKA se trasladan al núcleo, donde son capaces de activar numerosos factores de transcripción, entre los que



destaca la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB)<sup>7</sup>. Esta proteína CREB, junto con otros activadores nucleares, activa la transcripción de determinados genes que codifican para receptores y para factores de crecimiento neuronal o neurotrofinas, como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) (Martin y col., 1997; Patterson y col., 2001). Todas estas proteínas sintetizadas *de novo* por la neurona sufren entonces un transporte anterógrado hasta las dendritas, en donde van a favorecer tanto la formación de nuevas sinapsis nerviosas como la potenciación de aquellas ya existentes (Figura 16) (Giap y col., 2000; Barco y col., 2006).

Existe un mecanismo adicional de regulación de las LTP que implica a los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (GPCR). Estos receptores de membrana se activan tras la unión con un ligando específico y en función del tipo de receptor, pueden activar o inhibir este proceso. Los receptores de dopamina, por ejemplo, estimulan la AC favoreciendo así la activación de la vía AMPc/PKA/CREB, mientras que los receptores de somatostatina, que se encuentran acoplados negativamente a la AC, inhibirán esta vía (Baratta y col., 2002; Barco y col., 2006).

### 3.3.2.2. Depresiones a largo plazo

Las LTD, al contrario que las LTP, suponen la desensibilización más o menos duradera del terminal postsináptico. Se ha comprobado que pueden desencadenarse por distintos estímulos en función del tejido. Así, las células de Purkinje del cerebelo responden a una estimulación fuerte con una LTD mientras que, en el hipocampo, para generar una respuesta de este estilo la estimulación debe ser débil y sostenida en el tiempo (Dudek y Bear, 1992; Malenka y Bear, 2004; Citri y Malenka, 2008).

Se han descrito dos tipos de vías implicadas en la generación de las LTD: una dependiente, de nuevo, de los receptores NMDA y otra dependiente de determinado tipo de receptores metabotrópicos como los receptores de cannabinoides o los receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR) (Barco y col., 2006; Citri y Malenka, 2008).

La LTD activada por NMDA parece ocurrir cuando la estimulación del terminal se produce de manera continuada pero débil. Esto produce una entrada moderada de  $Ca^{2+}$  que activa, vía CaM, a la PP2A. Esta fosfatasa activa va a catalizar la defosforilación de otras proteínas como la PKA o los receptores AMPA (Hrabetova y Sacktor; 1996; Lee y col.,

---

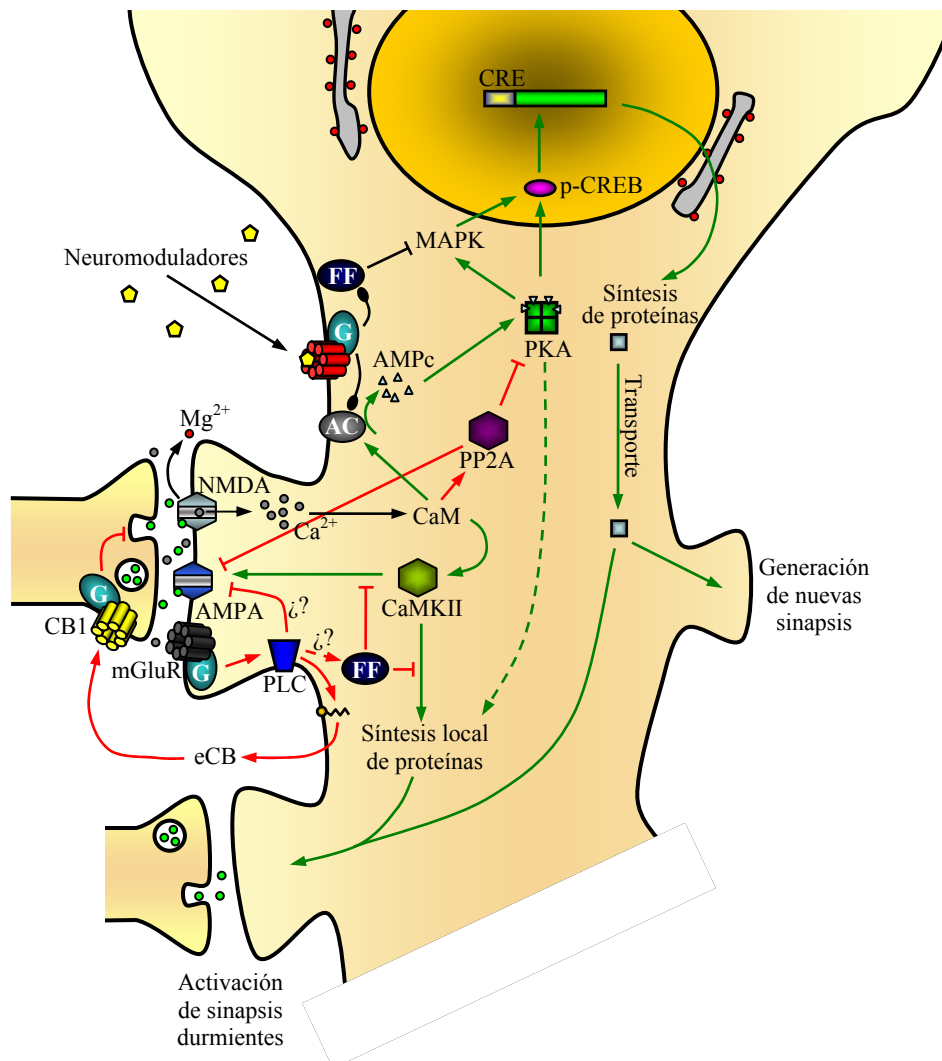
<sup>7</sup> Existen más detalles sobre la ruta AMPc/PKA/CREB en el capítulo dedicado a la somatostatina, apartado 4.3.



2000; Citri y Malenka, 2008). La desactivación de la PKA provoca la inhibición del sistema de transducción de señales que, en el caso de una LTP, conducía a la formación de nuevas sinapsis y potenciación de aquellas ya existentes. Por otro lado, la defosforilación de los receptores AMPA parece conducir a una internación y degradación de los mismos por un vía dependiente de vesículas de clatrina (Carroll y col., 1999; Ehlers, 2000; Citri y Malenka, 2008).

La activación de los mGluR y las LTD que generan están siendo objeto de estudio en la actualidad. Se sabe que en el hipocampo, la activación de este tipo de receptores activa la vía de la fosfolipasa C (PLC), con la consiguiente liberación de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). La cascada de señalización que se activa luego de estos segundos mensajeros implica a MAPK, como p38, ERK y la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) o la vía de las PTP (Rush y col., 2002; Gallagher y col., 2004; Li y col., 2007). Aunque también se ha demostrado que existen diferencias entre las distintas áreas cerebrales a este nivel (De Zeeuw y Yeo., 2005; Huang y Hsu, 2006; Citri y Malenka, 2008), el resultado final de esta activación conduce, al igual que en el caso de las LTD mediadas por NMDA, a una internación de los receptores AMPA por un mecanismo dependiente de clatrina (Wang y Linden, 2000; Snyder y col., 2001; Xiao y col., 2001).

Por último, se ha encontrado un último tipo de LTD que está mediado por endocannabinoides (eCB). Se sabe que en el SNC estas moléculas actúan como mensajeros retrógrados que se liberan por las células post-sinápticas como respuesta a una fuerte despolarización o a la activación de receptores acoplados a proteínas G (Chevalleyre y col., 2006; Citri y Malenka, 2008). En las sinapsis inhibitorias del hipocampo, por ejemplo, la activación de los mGluR y de los receptores NMDA favorece la entrada de  $Ca^{2+}$  y la activación de una fosfolipasa, posiblemente la PLC $\beta$  (Kreitzer y Malenka, 2005), que va a iniciar la síntesis de eCB, como el 2-araquidonoilglicerol (2AG). Los eCB liberados activan el receptor 1 de cannabinoides (CB1) en el terminal presináptico inhibiendo la liberación de neurotransmisores (Chevalleyre y Castillo, 2004). Dicha inhibición puede favorecer, a su vez, una estimulación débil del terminal postsináptico que, sostenida en el tiempo, termina generando una LTD (Malenka y Bear, 2004, Citri y Malenka, 2008).



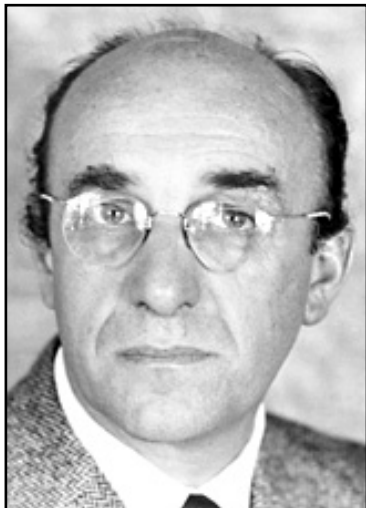
**Figura 16: Mecanismo molecular de plasticidad neuronal a largo plazo.** Las flechas en verde indican los mecanismos que generan una potenciación a largo plazo mientras que en rojo se destacan los mecanismos que generan la depresión a largo plazo. La apertura sostenida de los receptores ionotrópicos de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) favorece la expulsión de un ión de  $Mg^{2+}$  y la posterior apertura de los receptores de N-metil D-aspartato (NMDA), lo que permite la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior celular. Este  $Ca^{2+}$  se une a la calmodulina (CaM), que activa tanto la quinasa dependiente de CaM II (CaMKII), como la calcineurina (PP2A). La CaMKII puede estimular la adenilato ciclasa (AC), favorecer la síntesis a nivel local de proteínas y fosforilar a los receptores de tipo AMPA, modificando sus propiedades. Por otro lado, el AMPc generado activará la vía de la PKA/CREB y la síntesis de neurotrofinas y nuevos receptores que favorecerán la generación de nuevas sinapsis. Por el contrario, la PP2A inhibe la vía de la PKA y defosforila los receptores AMPA, que sufren una internación y desensibilización. La activación de los receptores metabotrópicos glutamatérgicos activan la fosfolipasa C (PLC) que, a su vez, desencadena una cascada de segundos mensajeros que, por un mecanismo que parece variar en función del tejido, termina induciendo una desensibilización de los receptores AMPA y una activación de distintas fosfatasa (FF) que inhiben la síntesis de proteínas. Además, esta PLC puede iniciar la síntesis de endocannabinoides (eCB) que, a través del receptor 1 de cannabinoides (CB1) inhibe la liberación de neurotransmisores en el terminal presináptico. Determinados neuromoduladores, como la SST o la dopamina, a través de sus receptores, pueden modificar estos procesos (flechas circulares).



## 4. SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO

### 4.1. DESCUBRIMIENTO DE LA SOMATOSTATINA

A finales de los años sesenta Krulich y col. (1968) identificaron, de manera inesperada, una sustancia en el hipotálamo ovino que era capaz de inhibir la secreción de la hormona de crecimiento o somatotropina *in vitro* en cultivos de células adenohipofisarias. A esta sustancia se le bautizó inicialmente como “factor inhibidor de la somatotropina”, por poseer una acción fisiológica antagónica al “factor liberador de la somatotropina” que había sido caracterizado por Dhariwal y col. (1965) unos años atrás. No obstante, se desconocía la naturaleza de dicho péptido hipotalámico hasta que, cinco años más tarde, Brazeau y col. (1973), trabajando en el laboratorio de Roger Guillemin, intentaron aislar, a partir de células



**Roger Guillemin**  
(1924- act.)

de hipófisis, el factor responsable de la liberación de la hormona del crecimiento (GH); en su lugar, aislaron un tetradecapéptido que inhibía la secreción de dicha hormona tanto *in vivo* como *in vitro*. Por este descubrimiento, Guillemin fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1977. Al tetradecapéptido aislado se le bautizó finalmente como “factor inhibidor de la liberación de la somatotropina” (SRIF, por sus siglas en inglés) o somatostatina (SST), término más usado actualmente, aunque no englobe sus múltiples acciones. Estudios posteriores demostraron que la inhibición de la liberación de la somatotropina es sólo uno de los múltiples efectos de la SST.

Las funciones de la SST se centran en modular la neurotransmisión, secreción glandular, contractibilidad de la musculatura lisa y proliferación celular.

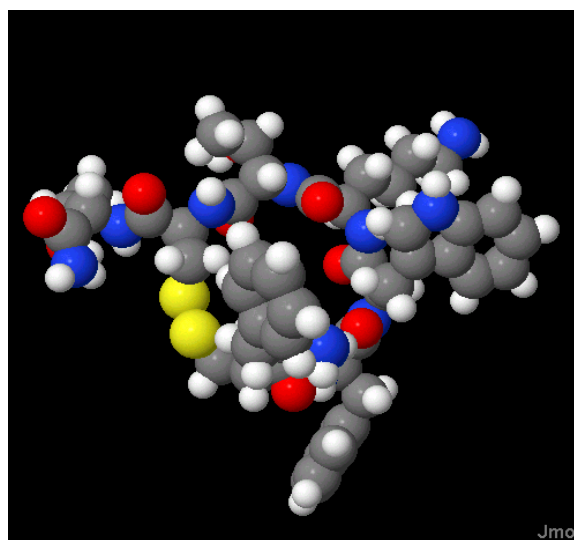
Se ha visto que la SST no sólo se encuentra en el hipotálamo sino que está ampliamente distribuido a lo largo del SNC, sistema nervioso periférico (SNP), tracto gastrointestinal y en la mayoría de los órganos periféricos (Hokfelt y col., 1975; Patel y Reichlin, 1978; Reichlin, 1983).

Se ha descrito la presencia de SST y de su ARNm en toda la escala de vertebrados, desde anfibios hasta mamíferos y, a pesar de las diferencias existentes entre las distintas especies, la homología en la secuencia de la SST entre todas ellas es muy elevada (Vaudry y

col., 1992; Yáñez y col, 1992). También se han encontrado análogos en algunas especies vegetales (Reichlin, 1983; Patel, 1992).

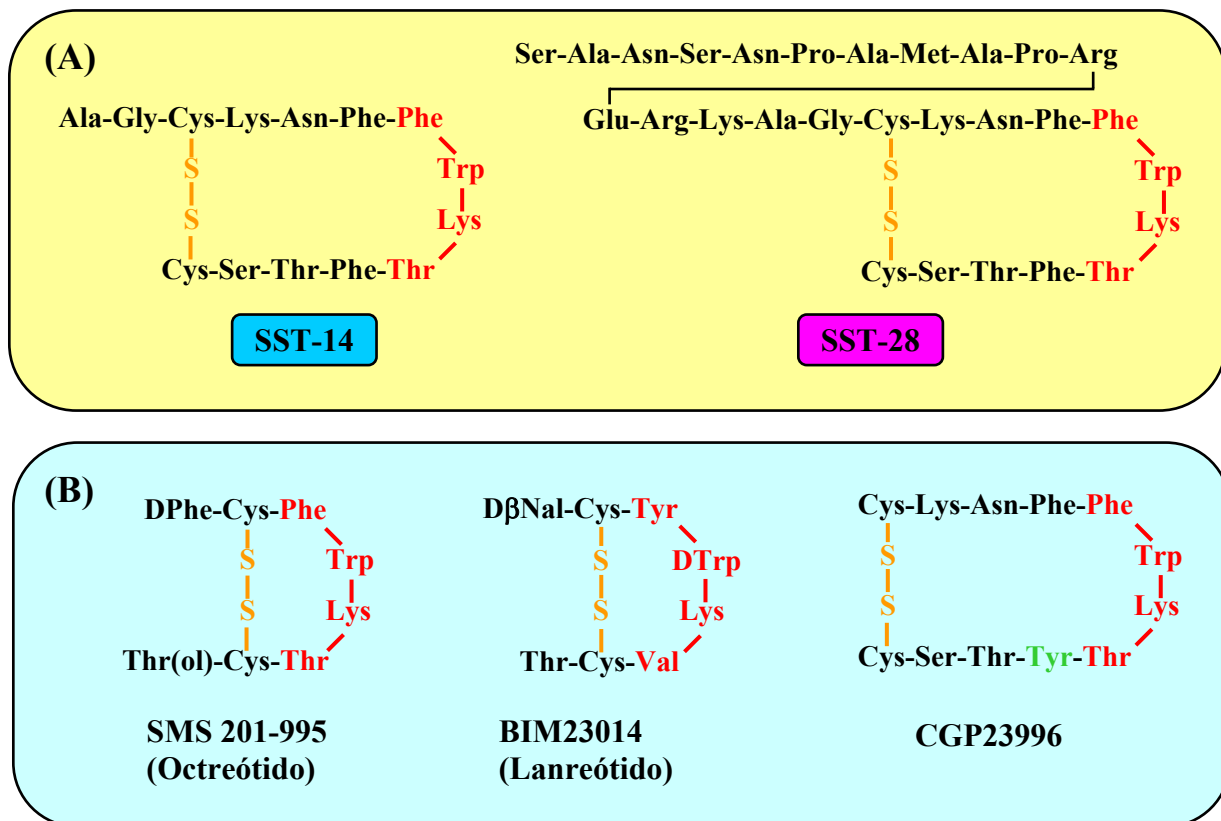
## 4.2. ESTRUCTURA DE LA SOMATOSTATINA

La SST se considera en la actualidad una familia filogenéticamente antigua de péptidos entre los cuales destacan dos con actividad biológica conocida: la SST-14, forma aislada e identificada en el hipotálamo, y la SST-28, aislada y caracterizada por Pradayrol y col. (1980). La SST-14 es un péptido básico de 1,64 kDa constituido por catorce aminoácidos cuya estructura cíclica se estabiliza mediante un puente disulfuro entre dos cisteínas situadas en las posiciones 3 y 14 de la molécula (Figura 17). La SST-28, de peso molecular 3,5 kDa, es una prolongación de la SST-14, conteniendo por tanto la secuencia completa de la SST-14 y 14 aminoácidos más en el extremo N-terminal.



**Figura 17: Estructura tridimensional de la somatostatina (SST).** En amarillo se destacan los dos átomos de azufre entre los cuales se forma un puente disulfuro.

Mediante modificaciones estructurales del anillo de la SST, se ha podido identificar el centro activo del péptido (Brown y col., 1977), situado entre los aminoácidos 7 y 10. Dado que la SST es una molécula de vida media muy corta y muy sensible a la degradación enzimática, este descubrimiento ha sido fundamental a la hora de diseñar análogos más cortos y de vida media más larga. Entre estos análogos destacan, por un lado, el SMS 201-995 (Octreótido) y el BIM23014 (Lanreótido), muy utilizados en clínica para tratar el gigantismo, la acromegalia y los tumores intestinales y, por otro lado, análogos como el CGP23996, en los que se sustituye una fenilalanina por una tirosina para que la molécula pueda ser yodada y, de este modo, utilizada como trazador (Figura 18).



**Figura 18. A:** Estructura química de la SST-14 y de la SST-28. **B:** Estructura química de distintos análogos de la SST. En rojo se destaca el centro activo de la molécula, en naranja el puente disulfuro y en verde la tirosina susceptible de yodación en el análogo CGP23996

### 4.3. BIOSÍNTESIS DE LA SOMATOSTATINA

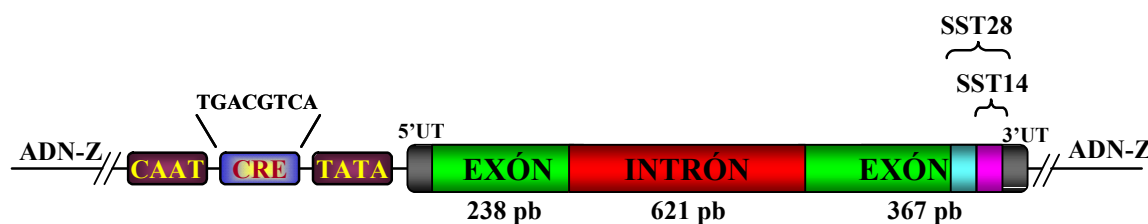
#### 4.3.1. Estructura y regulación del gen de la somatostatina

En los peces, existen dos genes independientes que codifican para cada una de las dos isoformas de SST, mientras que en los mamíferos, tanto la SST-14 como la SST-28 derivan de una única molécula precursora llamada prepro-SST, producto de un único gen (Patel, 1992). En estos últimos, cabe destacar que el gen de la SST se secuenció por primera vez en ratas (Montminy y col., 1984) y posteriormente en humanos, localizándose en el brazo largo del cromosoma 3. La región codificante del gen consta de dos exones de 238 y 367 pares de bases (pb) separados por un intrón de 621 pb. Entre los dos promotores (cajas TATA y CAAT) del extremo 5' se encuentra una secuencia palindrómica de 8 pb [5'-TGACGTCA-3'] que se denomina "elemento de respuesta al adenosín monofosfato cíclico (AMPC)" o CRE. Además, el gen está flanqueado en el extremo 5' y 3' por ácido



desoxirribonucleico (ADN) Z (ADN-Z), al que pueden unirse determinadas proteínas para regular la expresión génica (Figura 19).

La expresión y secreción de la SST está regulada por múltiples factores, tales como nutrientes, neurotransmisores y neuropéptidos. Además, en función del tejido, un mismo factor puede actuar de manera distinta. Los glucocorticoides, por ejemplo, disminuyen los niveles de ARNm de la SST en la corteza cerebral y el hipotálamo mientras que en el estómago y el páncreas inducen un aumento en la transcripción del gen (Papachristou y col., 1994). Otros factores conocidos que regulan la expresión de la SST se resumen en la Tabla 6.



**Figura 19:** Estructura del gen de la somatostatina (SST) en la rata.

No se conoce bien el mecanismo molecular mediante el cual estas moléculas regulan la transcripción del gen de la SST pero se piensa que muchos de ellos actúan de manera indirecta modulando la vía del AMPc, puesto que se ha demostrado que el AMPc aumenta los niveles del ARNm de la SST (Tolón y col., 2000) gracias a la región CRE del promotor. El modo en que el AMPc regula la transcripción del gen de la SST ha sido ya caracterizado y se resume en la Figura 21. Tras una estimulación de la enzima adenilato ciclasa (AC), se produce un aumento en los niveles intercelulares de AMPc que conduce a la activación de la



**Figura 20:** p-CREB unido a una región CRE del ADN.

PKA. A continuación, la subunidad catalítica de la PKA se traslada al núcleo, donde fosforila y activa a una proteína llamada CREB (proteína de unión a CRE, Figura 20) así como a unos coactivadores con actividad acetiltransferasa llamados CBP (proteína de unión a CREB) y p300. La proteína CREB fosforilada (p-CREB) se une a la región CRE del promotor y, a





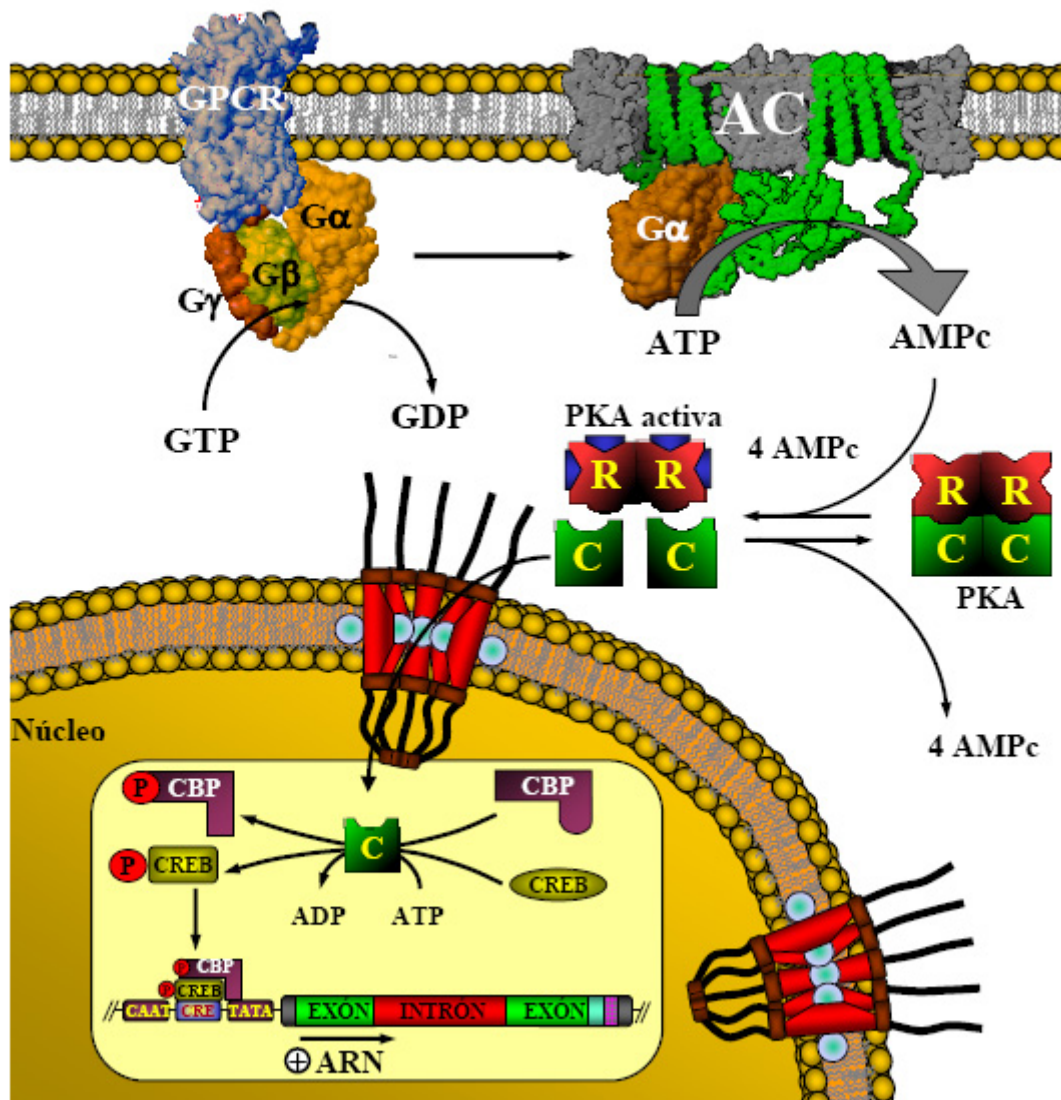
su vez, recluta a CBP/p300, los cuales van a favorecer la unión del complejo de transcripción a la caja TATA (Montmini y col, 1996; Andrisani, 1999). De este modo, se activa la expresión del gen de la SST.

Efectos sobre los niveles de ARNm de la SST		
↑	↓	↑ o ↓
AMPc Ca <sup>2+</sup> GMPc NO TSH Estrógenos GH IGF-I e IGF-II IL-1, IL-6 e IL-10 TNF	Insulina ACTH	Glucocorticoides

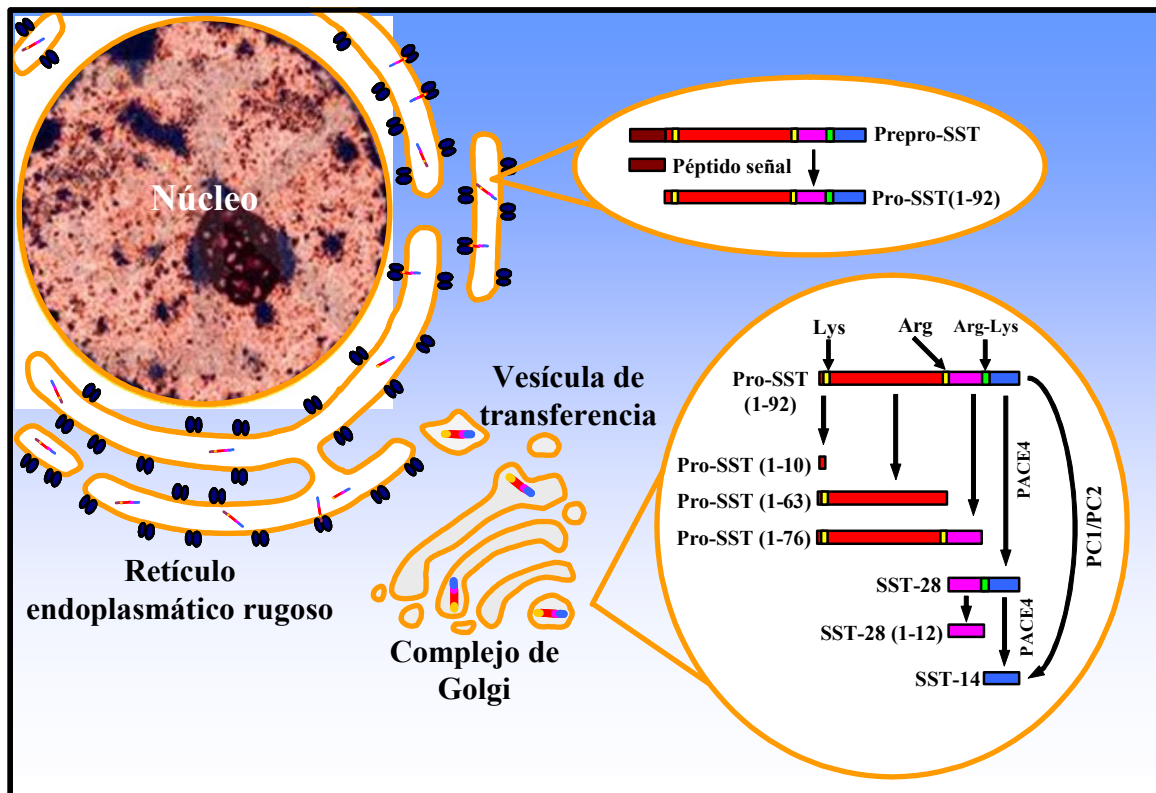
**Tabla 6: Regulación de la transcripción del gen de la somatostatina (SST) por distintos factores.** (Rubinow y col., 1995). AMPc: adenosín 3',5'-monofosfato cíclico. GMPc: guanosín 3',5'-monofosfato cíclico. NO: óxido nítrico. TSH: tirotropina. GH: somatotropina. IGF: Factor de crecimiento de tipo insulina. IL: Interleuquina. TNF: Factor de necrosis tumoral. ACTH: Corticotropina. ↑ Aumenta; ↓ Disminuye.

#### 4.3.2. Biosíntesis de la somatostatina

Como se ha descrito en el apartado anterior, la expresión del gen de la SST origina, en primer lugar, una molécula precursora llamada prepro-SST, que se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso. Esta molécula rápidamente se escinde entre la glicina-24 y la glicina-25, generando un péptido de 92 aminoácidos y 10 kDa denominada pro-SST (Figura 22). La pro-SST es transportada al aparato de Golgi y penetra al interior de las vesículas secretoras. Una vez allí, es hidrolizada de nuevo por tres dominios distintos, originando varios fragmentos sin actividad biológica tales como la SST-28<sub>[1-12]</sub>, la pro-SST<sub>[1-76]</sub>, la pro-SST<sub>[1-63]</sub> y la pro-SST<sub>[1-10]</sub> así como las dos formas biológicamente activas, la SST-14 y la SST-28. La ruptura proteolítica de la pro-SST por el dominio dibásico (Arg/Lys) y por el dominio monobásico (Arg) del extremo C-terminal generan SST-14 y SST-28, respectivamente,



**Figura 21: Regulación de la expresión del gen de la somatostatina (SST) mediada por AMPc.** La activación mediada por ligando de un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) desencadena la disociación de la proteína G heterotrimérica, que se activa por la entrada de guanósina 5'-trifosfato (GTP). Esta subunidad se acopla entonces a la enzima adenilato ciclasa (AC), que cataliza la transformación del adenosín 5'-trifosfato (ATP) en adenosín 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), el cual se une a la proteína quinasa A (PKA), activándola. La subunidad catalítica (C) de la PKA se traslada al núcleo, donde fosforila y activa a dos factores de transcripción, la proteína de unión a CRE (CREB) y la proteína de unión a CREB (CBP/p300). El factor de transcripción CREB y el cofactor CBP se unen entonces a una región del promotor denominada “elemento de respuesta al AMPc” (CRE), situada entre las cajas CAAT y TATA, permitiendo el reclutamiento de la maquinaria transcripcional. En función del tipo de GPCR y de la proteína G a la que se asocie, la vía se activará o se desactivará según se estimule o se inhiba a la AC.



**Figura 22:** Esquema de la síntesis y maduración de la somatostatina (SST) en mamíferos. PC: Prohormona convertasa. PACE: Enzima de corte en dominios dibásicos.

mientras que la hidrólisis por el dominio monobásico (Lys) del extremo N-terminal da lugar a la pro-SST<sub>[1-10]</sub> (antrina). Este procesamiento de la pro-SST es realizado por unas endoproteasas de la superfamilia de las Prohormona Convertasas (PC), de las cuales se han identificado, hasta el momento, siete especializadas en hidrolizar por dominios básicos llamadas PC1/PC3, PC2, Furina/PACE (Enzima de corte en dominios dibásicos, por sus siglas en inglés), PC4, PC5/6, PC7 y PACE4; así como dos isoformas más especializadas en la hidrólisis por dominios no básicos llamadas Isoenzima Subtilisina/Kexina (SKI)-1 y Proteína convertasa subtilisina/kexina (PCSK)-9/proteína neuronal regulada por apoptosis-1 (NARC-1) (Benjannet y col., 2004). Se ha demostrado que la expresión de PC1/PC3 y de PC2 se restringe principalmente a células endocrinas y neuronas y que estas isoformas son las encargadas de la maduración de la SST-14 a partir de la pro-SST (Patel y Galanopoulou, 1995; Winsky-Sommerer y col., 2003).



### 4.3.3. Distribución de la somatostatina en el organismo

Al poco tiempo de descubrirse la SST, numerosos estudios revelaron que este péptido no sólo se encuentra en el hipotálamo, sino que está ampliamente distribuido por todo el organismo (Tabla 7). La morfología típica de una célula somatostatinérgica es la de una neurona con múltiples prolongaciones dendríticas o la de una célula secretora con extensiones citoplasmáticas cortas, como en el caso de las células D del páncreas y tracto gastrointestinal. En ambos tipos de células somatostatinérgicas, la liberación de la SST es inducida por la despolarización de la membrana y modulada por una amplia gama de moléculas tales como iones, nutrientes, neuropéptidos, neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento (Tabla 8).

Principales localizaciones	Tipo celular	Localización
Sistema nervioso	Neuronas	Hipotálamo Corteza Sistema límbico Ganglios basales Ganglios autonómicos Médula espinal
Páncreas	Células D	Islotes de Langerhans
Intestino	Células D Neuronas	Glándulas mucosas Plexos submucoso y mientérico
Otras localizaciones		
Glándulas adrenales	-	Células medulares dispersas
Tiroides	Células C	Células parafoliculares dispersas (coexiste con la calcitonina)
Sistema urinario	-	Células de los glomérulos renales y de los tubos colectores
Sistemas sensoriales	-	Sistema olfatorio Sistema visual Sistema auditivo

Tabla 7: Distribución de la somatostatina en el sistema nervioso central y en tejidos periféricos.



Las células productoras de SST se localizan principalmente en el SNC y SNP, páncreas endocrino e intestino. También están presentes, aunque en menor proporción, en el tiroides, glándulas adrenales, glándulas submandibulares, riñón, órganos linfáticos, próstata, placenta y testículos (Patel, 1992). En el páncreas, las células somatostatinérgicas se encuentran en los islotes de Langerhans (Baetens y col., 1979) mientras que, en el tracto gastrointestinal, se han descrito dos tipos de células productoras de SST: las células D y las neuronas. Estas últimas se localizan en las glándulas mucosas, desde la porción cardiaca del estómago hasta el recto. En el tiroides, la SST coexiste con la calcitonina en una subpoblación de células C (Fierabracci y col., 1993). Cabe destacar que en la rata, por ejemplo, el intestino contiene aproximadamente el 65% de la SST total del organismo, mientras que el cerebro contiene el 25%, el páncreas el 5% y los órganos restantes el 5% (Patel, 1992).

<b>Efectos sobre la liberación de la somatostatina</b>	
<b>Estimulan la secreción</b>	<b>Inhiben la secreción</b>
Glucosa (Páncreas)	Glucosa (Hipotálamo)
VIP (Neocórtex y páncreas)	VIP (Hipotálamo)
Insulina (Hipotálamo)	Insulina (Páncreas e intestino)
Glucagón	GABA
Bombesina	Serotonina
Neurotensina	Corticotropina
Sustancia P	Opiáceos
Hormonas tiroideas	
Somatotropina	
IGF-I	

**Tabla 8:** Distintos factores que modulan la liberación de somatostatina.

#### **4.3.4. Distribución de la somatostatina en el sistema nervioso central**

A pesar de haber sido inicialmente descubierta en el hipotálamo (Pelletier y col., 1975), la SST se encuentra en mayor concentración en áreas cerebrales extrahipotálamicas. Así, la habénula, la amígdala, el septum, el tubérculo olfatorio, el sistema límbico y las capas II-III y IV-V de la corteza cerebral son áreas muy ricas en SST. El estriado y la sustancia gris son áreas con niveles moderados del péptido mientras que el cerebelo y el bulbo olfatorio poseen una concentración muy baja de SST (Schindler y col., 1997).



Mediante estudios de hibridación *in situ* se ha demostrado que, tanto en humanos como en ratas, el ARNm de la prepro-SST se encuentra ampliamente distribuido por el SNC (Garret y col., 1994). Así, se ha demostrado su presencia en todas las zonas del bulbo olfatorio, con niveles especialmente altos en la capa granular del bulbo accesorio. Además, se encuentran señales intensas en toda la corteza cerebral de la rata, especialmente en las capas V y VI y, de una forma más uniforme, en la corteza cerebral humana. En el hipocampo, todos los subcampos CA contienen ARNm de la prepro-SST, mientras que en el GD de la rata, el ARNm sólo se distribuye por la capa polimórfica, excluyendo la capa granular. En el núcleo dorsal del septum lateral, hay una señal muy marcada de células que contienen ARNm de prepro-SST, sólo superada por neuronas presentes en la amígdala.

En el globo pálido, no existen células con prepro-SST, ni en ratas ni en humanos, mientras que el estriado y el núcleo accumbens poseen cantidades moderadas de la misma (Augood y col., 1991). En el hipotálamo, la mayor densidad de células somatostatinérgicas se encuentran en el núcleo paraventricular. En dichas células se coexpresan los ARNm de la prepro-SST y de los receptores de somatotropina, sugiriendo una regulación de la liberación de la GH por las células somatostatinérgicas (Burton y col., 1992). Por otro lado, en la sustancia negra del cerebro humano no se ha descrito la presencia del ARNm de la prepro-SST. Además, mientras que en el cerebelo de rata se ha detectado dicho ARNm a nivel de la capa granular, en el humano parece estar totalmente ausente. Por último, se ha hallado ARNm de la prepro-SST en la médula, núcleo del tracto solitario y en los núcleos espinales del nervio trigémino, tanto en humano como en rata (Cooper y col., 1981; Johansson y col., 1984).

#### **4.4. ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LA SOMATOSTATINA**

##### **4.4.1. Acciones fisiológicas en tejidos periféricos**

En el tracto gastrointestinal, la SST inhibe la secreción de la mayoría de las hormonas intestinales estudiadas hasta la fecha. Además, inhibe la secreción intestinal exocrina (ácido gástrico, pepsina, bilis y fluido colónico), la actividad motora, el vaciamiento gástrico e intestinal y la absorción intestinal de  $Ca^{2+}$ , carbohidratos, aminoácidos y triglicéridos (Patel y Reichlin., 1978). Por otro lado, inhibe la proliferación de los linfocitos, de las células del epitelio gástrico e intestinal y de las células precursoras de cartílago y hueso (Weiss y col., 1981; Patel, 1992). En el tiroides, la SST inhibe la liberación de la tiroxina (T4) y de la





triyodotironina (T3) estimulada por la tirotropina (TSH), así como la liberación de la calcitonina. A nivel adrenal, inhibe la secreción de aldosterona estimulada por la angiotensina II y la secreción de catecolaminas medulares estimulada por acetilcolina. En los riñones, inhibe la liberación de renina estimulada por una hipovolemia y la absorción de agua mediada por la hormona antidiurética (ADH) (Patel., 1992).

En general, la mayoría de las acciones que presenta la SST en tejidos periféricos se pueden agrupar en dos: inhibición de la secreción e inhibición de la proliferación celular.

#### **4.4.2. Acciones fisiológicas en el sistema nervioso central**

En el SNC, la SST actúa como neurotransmisor y neuromodulador; es capaz de inhibir la secreción de un gran número de hormonas y neurotransmisores como la somatotropina, la dopamina, la noradrenalina, la hormona liberadora de tirotropina (TRH), la hormona liberadora de corticotropina (CRH) o la TSH. Sin embargo, la SST no posee efectos directos sobre otras hormonas como la prolactina, la corticotropina (ACTH) la serotonina o la acetilcolina, aunque en patologías como la enfermedad de Addison o la acromegalia, la SST es capaz de disminuir los niveles elevados de ACTH o de prolactina respectivamente (Epelbaum, 1992; Patel, 1999).

En el cerebro, la SST modula funciones cognitivas, locomotoras, sensoriales y de conducta, ejerciendo efectos tanto estimuladores como inhibitorios sobre las funciones autonómicas. Además, diversos estudios postulan que la SST ejerce un papel neurotrófico en el desarrollo embrionario del SNC (Schwartz y col., 1998). Así, en el hipotálamo embrionario humano se han detectado niveles altos de SST entre la duodécima y decimocuarta semana de gestación. Esta precoz y abundante aparición de SST sugiere que este neuropéptido es importante en la diferenciación neuronal (Yew y Chan, 1999).

En el hipocampo, se han encontrado neuronas ricas en SST y en receptores de SST, con una distribución preferente en los estratos *oriens* y piramidal del CA (Köhler y Chand-Palay, 1982). Estas neuronas presentan, en un alto porcentaje, inmunorreactividad para el neurotransmisor GABA y numerosos autores han descrito hiperpolarizaciones y despolarizaciones inducidas por SST en estas áreas del hipocampo (Pittman y Siggins, 1981; Scharfman y Schawartzkroin, 1988) así como un aumento en las LTP en el área CA3 (Matsuoka y col., 1991). Por otro lado, se sabe que la SST facilita los procesos de aprendizaje espacial y que la cisteamina, una molécula que inhibe la secreción de SST,



reduce dichos procesos (Guillou y col., 1998). Se ha demostrado, por ejemplo, que este péptido disminuye las corrientes de  $Ca^{2+}$  activadas por voltaje y favorece las de  $K^+$  (Wang y col., 1990; Moore y col., 1988), mientras que inhibe las corrientes postsinápticas a través de una inhibición en la liberación de glutamato (Tallent y Siggins, 1999). Además, la SST, a través de sus receptores acoplados a la AC y a las PTP, hechos que se detallan en el apartado 4.6., puede modular las LTP y LTD hipocampales y, de este modo, participar en los procesos de aprendizaje y memoria (Dutar y col., 2002; Baratta y col., 2002; Barco y col., 2006).

Por todo ello, el estudio de este neurotransmisor y neuromodulador es de gran interés a la hora de evaluar, desde un punto de vista bioquímico, las alteraciones cognitivas que se producen en enfermedades que alteran la función cerebral normal, tales como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, la corea de Huntington o los déficit cognitivos asociados a determinadas carencias nutricionales.

#### **4.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA SOMATOSTATINA**

La SST ejerce sus acciones biológicas, descritas anteriormente, a través de la interacción con receptores específicos de alta afinidad presentes en la membrana plasmática de las células diana (Patel y col., 1990). Estos receptores se acoplan, a través de proteínas G inhibitoras ( $G_i$ ), a distintos efectores, tales como la enzima AC, canales de  $Ca^{2+}$  y de  $K^+$ , PTP, MAPK, fosfolipasa  $A_2$ , fosfolipasa C y la bomba  $Na^+/H^+$ .

##### **4.5.1. Características estructurales y farmacológicas de los receptores de somatostatina**

Los receptores de SST (SSTR) se identificaron por primera vez en células  $GH_4C_1$  tumorales hipofisarias de rata (Schonbrunn y Tashjian, 1978). Posteriormente, se fueron acumulando pruebas basadas en estudios farmacológicos, bioquímicos y fisiológicos que indicaban la existencia de múltiples SSTR (Reubi, 1984). Esta aparente heterogeneidad se clarificó mediante técnicas de clonación molecular, que permitieron describir la existencia de cinco subtipos de SSTR que se han denominado SSTR1-SSTR5. En un principio, se clonaron los subtipos SSTR1 y SSTR2 de ratón, de humano y de rata (Yamada y col., 1992; Kluxen y col., 1992) y, posteriormente, el SSTR3 de ratón y de humano (Yasuda y col., 1992; Yamada, 1993) y el SSTR4 de rata y de humano (Demchyshyn y col., 1993; Raynor y col., 1993; Rohrer y col., 1993). Por último, se clonó el subtipo SSTR5 de rata y de humano (Bruno y col., 1992; O'Carroll y col., 1992; 1994).





Estructuralmente, los SSTR pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Los miembros de esta familia poseen siete dominios transmembrana hidrofóbicos plegados en  $\alpha$ -hélice, de 20 a 25 aminoácidos de longitud, separados por bucles extra e intracelulares de residuos hidrofílicos, una secuencia N-terminal extracelular y una secuencia C-terminal intracelular (Figura 23). El análisis de homología de la secuencia aminoacídica de estos subtipos de SSTR revela que un 34% de estos aminoácidos son invariables. La mayor similitud se encuentra en los dominios transmembrana, mientras que los extremos N- y C-terminal son los que más heterogeneidad presentan (Reisine y Bell, 1995a; 1995b), lo cual hace que el número total de aminoácidos que constituye cada tipo de receptor varíe mucho en función del subtipo y de la especie animal en la que se exprese (Møller y col., 2003).

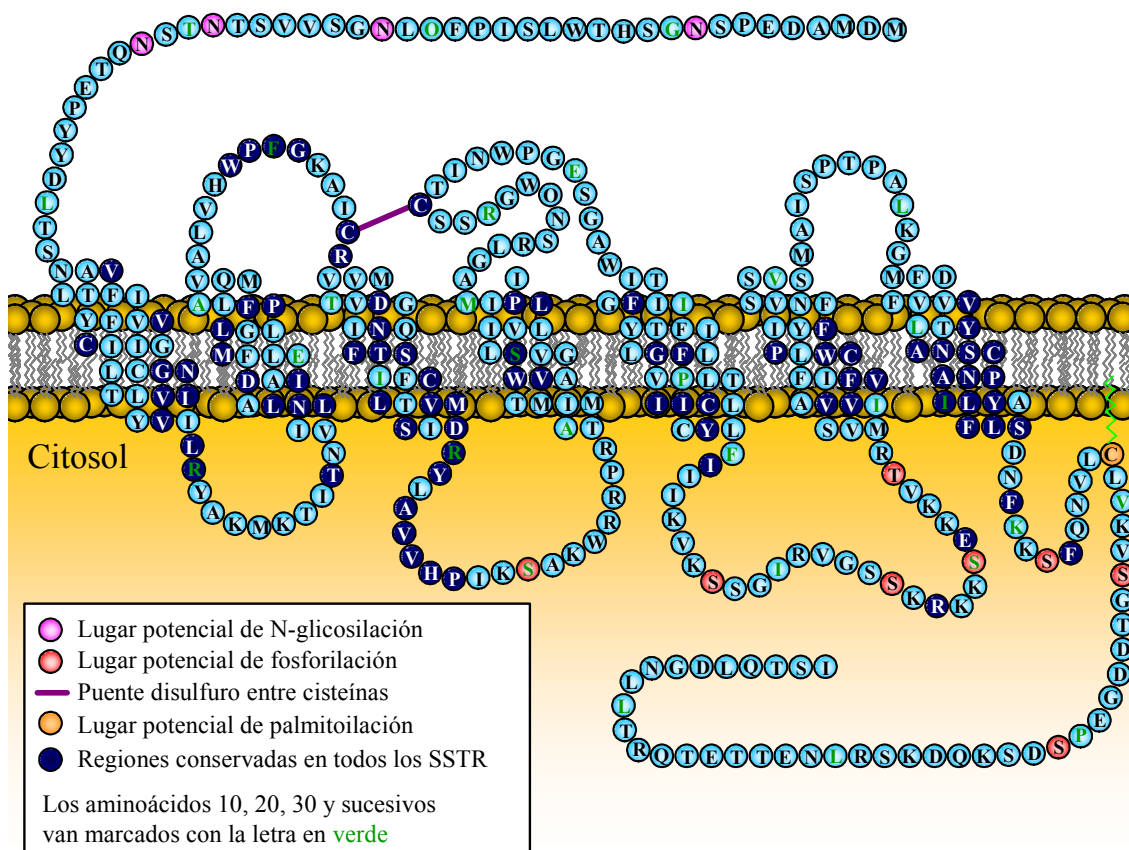


Figura 23: Representación esquemática del receptor de somatostatina tipo 2 (SSTR2) de rata.



Todos los SSTR presentan una secuencia muy conservada en el séptimo dominio transmembrana, [YANSCANP/LY], que constituye la seña de identidad de estos receptores. Además, como el resto de los GPCR, los SSTR tienen entre una y cuatro secuencias consenso de glicosilación asociadas a asparagina. No obstante, el subtipo SSTR5 presenta un lugar adicional de glicosilación en el segundo bucle extracelular mientras que el SSTR2 puede igualmente glicosilarse en la parte superior del sexto dominio transmembrana (Eppler y col., 1992). Por otro lado, todos los SSTR presentan entre tres y ocho sitios de reconocimiento para la PKA y la PKC en el dominio citoplasmático C-terminal y a lo largo del segundo y tercer bucle intracelular, lo que indica que estos receptores podrían ser regulados mediante fosforilaciones en determinados residuos de dichos dominios. Además, salvo el SSTR3, todos los SSTR poseen un tercer bucle intracelular entre los segmentos transmembrana quinto y sexto que parece intervenir en el acoplamiento a las proteínas  $G_i$ , así como un residuo de cisteína tras el séptimo dominio transmembrana. A este residuo se le puede unir ácido palmítico, anclando esta región a la membrana plasmática y creando así un cuarto bucle citoplasmático (Figura 23). Por otro lado, el subtipo SSTR3, que carece de esta región de palmitoilación, presenta un dominio C-terminal mucho más largo que el resto de los SSTR. Todos los receptores poseen residuos de tirosina en los bucles intracelulares y en el extremo C-terminal, cuya fosforilación regula la internación de los mismos (Beaumont y col., 1998; Tulipano y Schulz, 2007).

Existen numerosos estudios que demuestran que el subtipo SSTR1 une con similar afinidad la SST-14 y la SST-28. Sin embargo, muy pocos análogos sintéticos pueden unirse con alta afinidad a este receptor y ninguno es específico del SSTR1. El subtipo SSTR2 presenta también una alta afinidad por los dos péptidos endógenos, así como por el SMS 201-995. La SST-14 y la SST-28 se unen también con alta afinidad al receptor SSTR3, aunque éste presenta muy baja afinidad por el SMS 201-995. Por otro lado, el BIM 23056 parece ser específico del SSTR3. El subtipo SSTR4 presenta una homología del 61% con SSTR1, por lo que su afinidad por los análogos sintéticos así como por las formas endógenas de SST es similar a éste. Por su parte, el receptor SSTR5 posee unas cualidades únicas dentro de la familia de los SSTR ya que muestra hasta 6 veces más afinidad por la SST-28 que por la SST-14 y, además, se une a una gran cantidad de análogos sintéticos (O'Carroll, 1994).

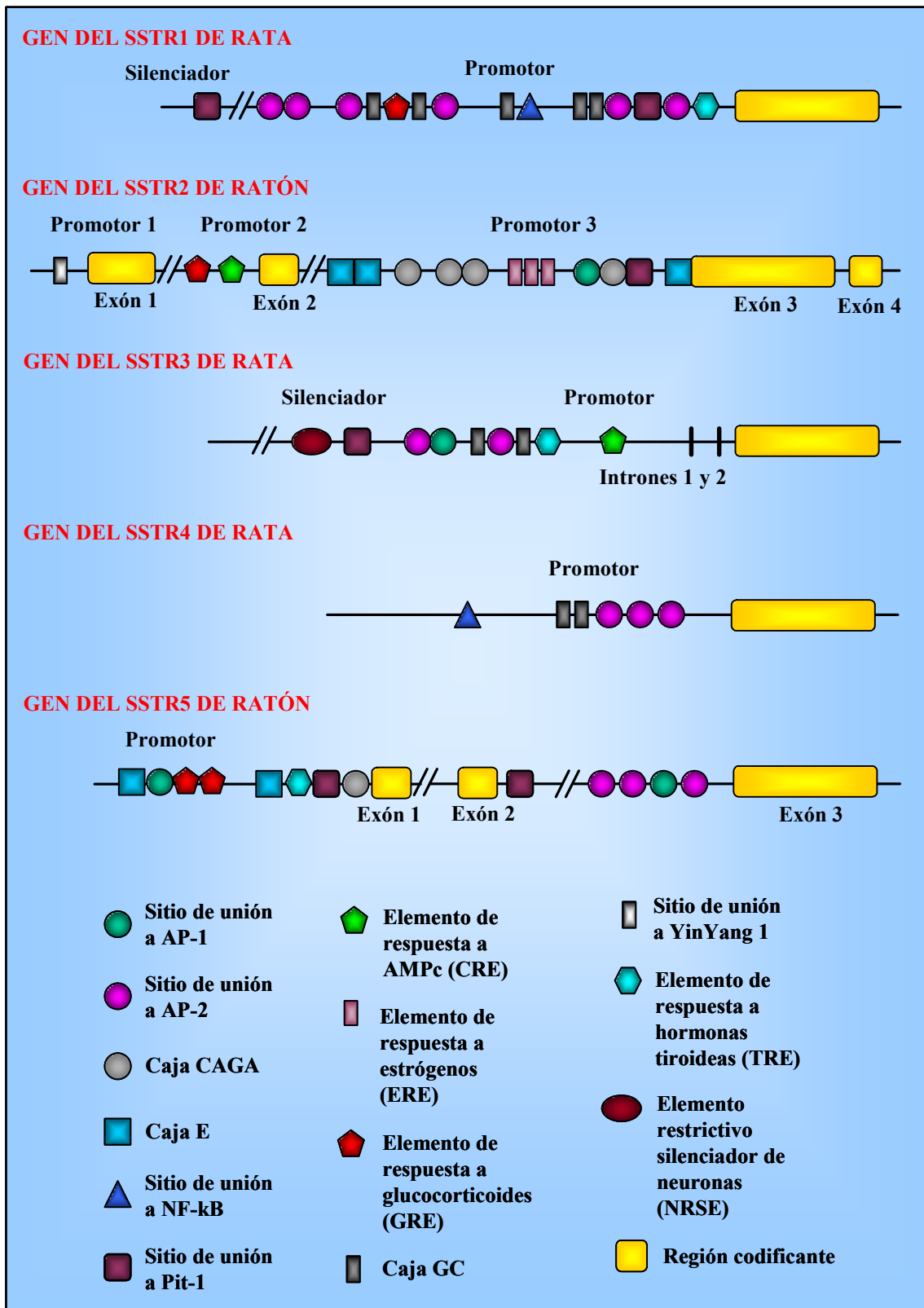


#### **4.5.2. Estructura de los genes de los receptores de somatostatina**

En humanos, los genes que codifican para los cinco subtipos de receptores de SST se localizan en distintos cromosomas. Así, los genes del SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4 y SSTR5 se encuentran en los cromosomas 14, 17, 22, 20 y 16, respectivamente. Sin embargo, en la rata, los genes del SSTR2 y del SSTR5 se encuentran en el cromosoma 10, mientras que los genes del SSTR1, SSTR3 y SSTR4 se sitúan en los cromosomas 6, 7 y 3, respectivamente. Los genes de los SSTR no presentan intrones en las regiones codificantes, con excepción del gen del SSTR2 de ratón y rata, que contiene dos intrones; por consiguiente, mediante un procesamiento alternativo, dicho gen puede dar lugar a dos subtipos de SSTR2, el SSTR2A y el SSTR2B. Sin embargo, se ha observado que las regiones 5' terminal no traducidas (5' UTR) de los genes del SSTR2 y del SSTR5 de ratón y del SSTR3 de rata contienen también intrones (Baumeister y Meyerhof, 2000).

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios enfocados en caracterizar las zonas promotoras de estos cinco genes. Así, se ha demostrado que, con excepción del gen del SSTR2, que posee tres zonas promotoras, el resto de los SSTR contienen un único promotor en la mayoría de las especies (Olias y col., 2004). En las zonas promotoras de los cinco SSTR existen secuencias consenso de distintos elementos de respuesta, que permiten la activación de la expresión mediada por diferentes vías de señalización (Figura 24).

Hauser y col. (1994) identificaron en el receptor SSTR1 sitios de unión para el factor de transcripción específico de hipófisis Pit-1. Este factor Pit-1 actúa como un regulador clave en la secreción de la GH a nivel transcripcional, regulando la actividad tanto del gen de la somatotropina como de los receptores que activan las vías de señalización en células somatotróficas. Se ha demostrado que el silenciamiento de Pit-1 mediante el empleo de oligonucleótidos antisentido bloquea la expresión de SSTR1 (Baumeister y col., 2000). Este elemento también se ha encontrado en los promotores de los genes para el SSTR2, el SSTR3 y el SSTR5.



**Figura 24:** Estructura de los genes de los 5 subtipos de receptor de somatostatina (SSTR) y principales elementos de respuesta de los promotores.



El gen del receptor SSTR2, que es el más estudiado, no presenta las secuencias clásicas TATA y CAAT en ninguno de los tres promotores (Greenwood y col., 1995). En su lugar, se han encontrado elementos proximales iniciadores que, en la rata, están constituidos por sitios de unión con alto contenido en guanina y citosina mientras que, en humanos, son secuencias ricas en timina y citosina. La activación del primer promotor de este gen sólo se ha encontrado en células hipofisarias AtT-20; se cree que un elemento de unión a YinYang 1 presente en este promotor podría mediar como represor de la transcripción y, de ese modo, ser responsable de esta especificidad celular. El segundo promotor está activo en aquellos tejidos en los que la SST y sus receptores ejercen funciones fisiológicas vitales, tales como el cerebro, la hipófisis, las glándulas adrenales, el páncreas, el estómago o los testículos. El tercer promotor, por el contrario, se encuentra activado en los pulmones, el riñón, el bazo, el útero y los ovarios (Olias y col., 2004).

Los subtipos SSTR3, SSTR4 y SSTR5 carecen de las cajas TATA y CAAT (Xu y col., 1995a; Baumeister y col., 1998) mientras que poseen multitud de dupletes GC repetitivos y cajas E, que son motivos iniciadores que se encuentran normalmente en promotores carentes de la caja TATA (Olias y col., 2004).

Los genes de los cinco SSTR poseen sitios de unión para los factores de transcripción AP-1 y AP-2, que les confiere un elemento adicional de respuesta al AMPc al margen del elemento CRE identificado en SSTR2 y SSTR3 (Greenwood y col., 1994), ya que se ha demostrado que el AMPc puede estimular la actividad de estos factores de transcripción (Müller y col., 1989; García y col., 1996; 1999). Por otro lado, se han identificado elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) en los genes del SSTR1, del SSTR2 y del SSTR5 (Kraus y col., 2000) y, por último, un elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) en el gen del SSTR1, del SSTR3 y del SSTR5. En su conjunto, todos estos sitios en los promotores de los genes de los SSTR podrían explicar la regulación de la expresión de los mismos dependiente del metabolismo del organismo (Olias y col., 2003).

### **4.5.3. Regulación de los receptores de somatostatina**

#### **4.5.3.1. Regulación dependiente de agonista**

Actualmente, se sabe que la fosforilación juega un papel importante en la regulación de los receptores y se ha demostrado que una vez producida la activación de los receptores



por la unión a su agonista, éstos se desensibilizan mediante la fosforilación en residuos de serina y treonina presentes en el dominio C-terminal del receptor. Esta fosforilación se realiza por proteína quinasas entre las que destacan, por un lado, la PKA y la PKC (Hipkin y col., 2000; Oomen y col., 2001) y, por otro lado, la familia de quinasas de los GPCR (GRK) (Gainetdinov y col., 2004), que incluye 7 isoformas denominadas GRK1-GRK7. Mediante estudios de hibridación *in situ*, se ha demostrado que las isoformas GRK2, GRK3, GRK5 y GRK6 son las que se expresan mayoritariamente en el cerebro de la rata. Además, se ha comprobado que GRK2 y GRK3 son isoformas citosólicas que se trasladan a la membrana una vez activadas, mientras que GRK5 y GRK6 son isoformas que se encuentran ancladas a la cara interna de la membrana plasmática (Erdtmann-Vourliotis y col., 2001).

La fosforilación en el dominio C-terminal del SSTR por las GRK es la señal para que se produzca el reclutamiento de unas proteínas denominadas  $\beta$ -arrestinas. La unión de las  $\beta$ -arrestinas al receptor favorece, a su vez, la unión del complejo de proteínas adaptadoras 2 (AP2) y de la clatrina, produciéndose la internación del SSTR y su desacoplamiento de la proteína Gi (Figura 25) (Kreuzer y col., 2001; Oakley y col., 2001). El receptor, una vez internado, sufre una rápida degradación y reciclaje hacia el espacio extracelular (Dohlman y col., 1991; Strader y col., 1995).

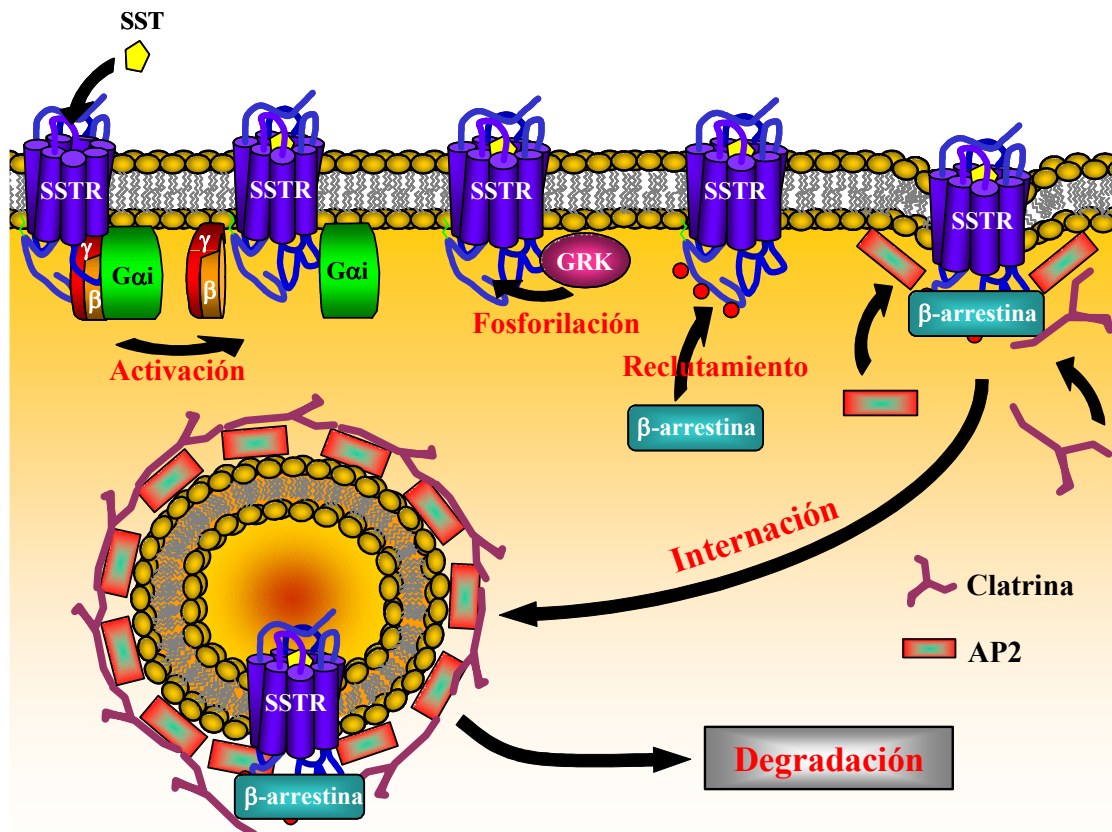
Todos los SSTR de rata, a excepción del SSTR4, se internan en la célula siguiendo el mecanismo general expuesto anteriormente aunque con pequeñas modificaciones. El SSTR4, sin embargo, posee una alanina en lugar de una treonina en el residuo 331 del extremo C-terminal y se ha observado que cuando dicho receptor se transfecta a células embrionarias de riñón humano, es resistente a la internación y desensibilización una vez activado por SST. Por el contrario, cuando se transfectan los subtipos SSTR1, SSTR2 y SSTR3 de rata, se puede observar una rápida internación y desensibilización de los mismos tras su exposición a la SST-14 y a la SST-28, mientras que la internación del SSTR5 sólo ocurre en presencia de SST-28 (Roth y col., 1997; Kreienkamp y col., 1998).

Por otro lado, existe controversia acerca de si la internación de los receptores es sinónimo de desensibilización; algunos autores sostienen que la fosforilación en el dominio C-terminal por parte de la PKA o la PKC no produce reclutamiento de  $\beta$ -arrestinas aunque sí la endocitosis de los receptores mediada por clatrina (Hipkin y col., 2000; Oomen y col., 2001). Se cree que la fosforilación mediada por estas quinasas se produce en residuos distintos a los que permiten el reconocimiento de las



$\beta$ -arrestinas y que la señal generada, si bien produce la internación de los SSTR, no desensibiliza las células. Por tanto, se puede decir que, aunque las  $\beta$ -arrestinas están implicadas en el proceso de desensibilización, no parecen fundamentales para la internación de los receptores (Brasselet y col., 2002).

Además de una desensibilización, los SSTR pueden ser regulados al alza. Así, tras la exposición crónica de los distintos subtipos de SSTR a sus agonistas, la densidad de SSTR1, SSTR2 y SSTR4 aumenta en la superficie celular mientras que la densidad de los receptores SSTR3 y SSTR5 no se altera (Hukovic y col., 1996). El mecanismo de esta regulación no está demasiado claro. Se ha demostrado que la regulación al alza del SSTR1 se produce de



**Figura 25: Mecanismo de desensibilización e internación de los receptores de somatostatina (SSTR) dependiente de agonista.** La llegada de la somatostatina (SST) al SSTR activa el receptor, lo que conduce a la disociación de la subunidad  $\alpha$  de la subunidad  $\beta/\gamma$  de las proteínas G inhibitoras (Gi). El receptor es entonces fosforilado en el dominio C-terminal por las quinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRK). Una vez fosforilado, recluta a la  $\beta$ -arrestina que, a su vez, permite la unión del complejo de proteínas adaptadoras AP2 y de la clatrina, formándose una vesícula de endocitosis que interna el receptor para su posterior degradación.





una manera dependiente de temperatura y por reclutamiento de un reservorio del SSTR1 presente en el citoplasma de las células somatostatinérgicas. Este reclutamiento no requiere síntesis *de novo* del receptor y parece depender de señales presentes en el extremo C-terminal del mismo (Hukovic y col., 1999).

En resumen, se puede decir que todos los procesos de regulación mediada por agonista, ya sea endocitosis, desensibilización o regulación a la alza de los SSTR, dependen del agonista utilizado, del subtipo de receptor y del tejido en el que se expresa (Olias y col., 2004).

#### **4.5.3.2. Homo- y Heterodimerización de los receptores de somatostatina**

Existen numerosas pruebas farmacológicas y bioquímicas que demuestran que los SSTR son capaces de formar homo- y heterodímeros funcionales en células transfectadas y que dicha oligomerización modifica las propiedades de los receptores, tales como la afinidad por sus ligandos, la transducción de señales, la internación y la regulación a la alza (Rocheville y col., 2000a; 2000b). Se sabe, por ejemplo, que el SSTR1 no sufre internación mediada por agonista cuando se transfecta en células CHO (Hukovic y col., 1996) mientras que sí que se produce dicha internación cuando se co-transfecta con el SSTR5, por lo que la formación de un heterodímero podría ser necesaria en algunos tejidos para el proceso de desensibilización al agonista (Patel y col., 2002). Además, se ha demostrado que esta formación de heterodímeros no es un proceso aleatorio y que determinados subtipos se asocian con otros de manera específica. Así, el SSTR1 se asocia al SSTR5 pero no al SSTR4 (Grant y col., 2004) mientras que el SSTR2 tiene preferencia para asociarse con el SSTR3 (Pfeiffer y col., 2001) y modificar sus características de unión a ligando y transducción de señales. El heterodímero SSTR2/SSTR3, por ejemplo, posee un patrón similar al SSTR2 en su capacidad para inhibir la AC y una menor tasa de desensibilización que el homodímero SSTR2/SSTR2 mientras que la función del SSTR3 desaparece casi por completo tras su asociación con el SSTR2 (Pfeiffer y col., 2001).

Los SSTR no sólo forman dímeros entre ellos sino que también tienen capacidad para formar heterodímeros con otros GPCR. Así, se ha demostrado que el SSTR2 está íntimamente relacionado con el receptor  $\mu$  de opioides ( $\mu$ OP) cuando ambos se coexpresan en células HEK. Aunque las capacidades de unión a ligando de ambos receptores no se modifican, sí que se aprecian cambios en la fosforilación, desensibilización e internación de





los mismos (Pfeiffer y col., 2002). De modo similar, el SSTR5 puede asociarse con el receptor D2 de dopamina, aumentando su capacidad de transducción de señales y modificando las propiedades farmacológicas de los dos receptores por separado (Rocheville y col., 2000a). La importancia farmacológica del heterodímero SSTR2/ $\mu$ OP se ha demostrado en experimentos *in vivo* al colocalizar ambos receptores en el *locus coeruleus*, una región del cerebro implicada en la dependencia a los opiáceos, y explica, al menos parcialmente, porqué el octreótido actúa como un antagonista de  $\mu$ OP y reduce los síntomas del síndrome de abstinencia en personas drogodependientes (Bell y col., 1999; Maurer y col., 1982).

#### 4.5.3.3. Regulación de la expresión de los receptores de somatostatina

La regulación de los genes que codifican para los distintos SSTR depende del tejido en que se expresen y se encuentra influenciada por una gran variedad de hormonas e, incluso, por el estado de salud del organismo. Se ha visto, por ejemplo, que en la epilepsia se produce una disminución en los niveles del SSTR2 (Csaba y col., 2005). Se ha descrito un descenso en la expresión de este mismo subtipo de receptor cuando se realiza una infusión intracerebroventricular del péptido  $\beta$ -amiloide, un modelo animal de enfermedad de Alzheimer, (Burgos-Ramos y col., 2007) y en la encefalomiелitis autoinmune experimental, un modelo experimental de esclerosis múltiple (Aguado-Llera y col., 2007). Además, en enfermedades como la diabetes mellitus tipo I o en periodos de ayuno se observa, en la rata, una disminución en los niveles del ARNm de los subtipos SSTR1, SSTR2 y SSTR3 en la hipófisis y del SSTR5 en el hipotálamo; cuando estas ratas reciben insulina, sólo los niveles del ARNm del SSTR5 retornan a los valores control (Bruno y col., 1994). Esto demuestra que la transcripción del gen de este subtipo es activada directa- o indirectamente por la insulina. Además, en las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina, el gen del SSTR5 presenta altos niveles de expresión.

Se ha demostrado también que el ARNm de los SSTR aumenta como respuesta a la gastrina, al factor de crecimiento epidérmico (EGF), al AMPc o a la propia SST (Patel y col., 1993; Greenwood y col., 1994; Kraus y col., 1999; Møller y col., 2003). Por otro lado, los estrógenos, *in vitro*, inducen, en células de prolactinoma de rata y en cultivos primarios de hipófisis de rata, una regulación al alza del ARNm del SSTR2 y del SSTR3 así como una disminución del ARNm del SSTR1 (Djordjijevic y col., 1998). *In vivo*, se ha demostrado que



los estrógenos inducen un aumento en el ARNm de SSTR1, SSTR2 y SSTR3, mientras que los niveles del SSTR5 están regulados a la baja en la hipófisis de rata (Kimura y col., 1998). Además, se ha demostrado que la testosterona aumenta los niveles del ARNm de los subtipos SSTR1, SSTR2 y SSTR3 (Vidal y col., 1994; Bouyer y col., 2008).

Las hormonas tiroideas también parecen estar implicadas en la regulación de la transcripción de los SSTR. Se ha observado, por ejemplo, que en ratones con células tumorales de tiroides TtT-97, la expresión de los cinco subtipos de receptores es indetectable en estas condiciones de hipotiroidismo; sin embargo, el tratamiento con hormonas tiroideas induce la expresión de los genes del SSTR1 y del SSTR5, aunque a niveles muy bajos, mientras que los ARNm de los otros genes de SSTR permanecen indetectables (James y col., 1997).

Se ha demostrado también que los glucocorticoides pueden regular la expresión génica de los SSTR de manera dependiente del tiempo. Así, una exposición a glucocorticoides durante un corto periodo de tiempo induce un aumento en el ARNm del SSTR1 y del SSTR2, mientras que un tratamiento prolongado inhibe la transcripción de ambos (Xu y col., 1995b). Por otro lado, se ha demostrado que, en la rata, una adrenalectomía disminuye la densidad de SSTR en el hipocampo, el estriado y el hipotálamo y que un tratamiento con glucocorticoides (dexametasona) retorna la densidad de SSTR a los valores control (Rodríguez y col., 1988)

#### **4.5.4. Distribución de los receptores de somatostatina**

Mediante estudios autorradiográficos, técnicas de hibridación *in situ* e inmunocitoquímica, se ha podido demostrar la existencia de SSTR en el SNC, glándulas adrenales, páncreas, tracto gastrointestinal y multitud de líneas celulares (Meyerhof, 1998).

##### **4.5.4.1. Distribución en el Sistema Nervioso Central**

En el cerebro de la rata, se han localizado los ARNm de los SSTR1-5, mediante hibridación *in situ*, en corteza, estriado, hipotálamo, amígdala e hipocampo (Tabla 9). El subtipo SSTR1 es muy abundante a lo largo del eje neural mientras que el SSTR2 es el más abundante en corteza. Por su parte, el SSTR3 se expresa principalmente en el cerebelo mientras que el subtipo SSTR5 es especialmente abundante en hipotálamo e hipófisis, con niveles muy bajos en otras áreas cerebrales (Bruno y col., 1993; Meyerhof, 1998).



Mediante sondas de ADN complementarias a la secuencia del ARNm de los SSTR, se ha comprobado que el transcrito de SSTR1 se encuentra ampliamente distribuido por todo el SNC de la rata, encontrándose los niveles más altos en el hipocampo, hipotálamo, corteza y amígdala (Meyerhof, 1998), aunque también puede encontrarse en menor cantidad en el cerebelo y en la médula espinal. En el encéfalo, el ARNm de SSTR1 puede observarse en las capas V-VI de la corteza cerebral, en la corteza olfativa primaria, en la *taenia tecta*, el subículo, la corteza entorrinal, la capa granular del GD, la amígdala y los núcleos cerebelares. No se han detectado transcritos de dicho receptor en la hipófisis (Pérez y col., 1994).

El ARNm del SSTR2 de rata, ratón y humano fue detectado por Patel y col. (1993) en la hipófisis, la corteza cerebral y el hipotálamo. Este subtipo es el más abundante en el SNC, con un patrón de distribución muy similar al del SSTR1. El subtipo SSTR2 se encuentra en las capas V-VI de la corteza cerebral, *taenia tecta*, claustró, núcleo endopiriforme, *locus coeruleus*, habénula media, subículo, la capa granular del GD, el estriado y la amígdala (Pérez y col., 1994).

Los niveles más altos de ARNm del SSTR3 se han encontrado en el cerebelo de la rata (Bruno y col., 1993), aunque se pueden encontrar también en la hipófisis, el bulbo olfatorio, la corteza olfatoria primaria, los islotes de Calleja, la habénula media, la amígdala, la capa granular del GD, el hipocampo, la corteza cerebral y en varios núcleos talámicos y pontinos. En el estriado, sus niveles de expresión son muy bajos (Pérez y col., 1994).

En la rata, el receptor SSTR4 se expresa principalmente en la corteza, especialmente en las capas IV y VI, y en el hipocampo, en especial en los subcampos CA1 y CA2. También se encuentra en el hipotálamo, el estriado y la amígdala, pero no en el cerebelo (Bruno y col., 1992).

El subtipo SSTR5 es el menos extendido de todos subtipos de receptores de SST. Su transcrito ha sido identificado en la hipófisis y el hipotálamo y, en menor medida, en la amígdala y el bulbo olfatorio. En otras áreas cerebrales, los niveles de ARNm de este subtipo son muy bajos o prácticamente indetectables (Bruno y col., 1993).

#### **4.5.4.2. Distribución en los tejidos periféricos**

Los ARNm de los distintos subtipos de SSTR se distribuyen de diferente manera dependiendo del tejido (Tabla 9). En los islotes de Langerhans del páncreas endocrino están



presentes todos los subtipos de SSTR, siendo el SSTR2 el más abundante, al igual que ocurre en las glándulas adrenales. En el bazo, por el contrario, el patrón de expresión de los subtipos es SSTR3 > SSTR1 = SSTR4 = SSTR5 > SSTR2. El estómago y el intestino expresan todos los subtipos a excepción del SSTR2 y del SSTR4. En el corazón, el SSTR4 es el más abundante, aunque también se han hallado niveles moderados del SSTR1 y del SSTR5. En el hígado, el único que se expresa es el SSTR3 y, en el pulmón, lo hace exclusivamente el SSTR4 (Bruno y col., 1993; Patel y col., 1993; Reisine y Bell, 1995a; 1995b; Patel y col., 1999). La amplia distribución de SSTR en tejidos tan diferentes del organismo es una prueba más del amplio rango de acciones que realiza y de su importancia en el organismo.

Tejido	Subtipo de receptor				
	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
<b>SNC</b>					
Corteza	++++	++++	++	++	-
Hipocampo	+++	+++	++	++++	-
Estriado	+++	+++	++	+	-
Amígdala	++++	++	+++	+	+
Bulbo olfatorio	++	+++	++	++	+
Tálamo	++	++	++	+	-
Hipotálamo	+	++	+	+	++++
Cerebelo	+	-	++++	-	+
Hipófisis	++	++	+	+	++++
<b>Tejidos periféricos</b>					
Páncreas	-	+	-	-	-
Islotes de Langerhans	++	++++	+	++	+
Glándulas adrenales	+	++++	+	-	-
Intestino	+	-	+	++	++
Corazón	+	+++	+	++++	++
Riñón	-	++	+	++	-
Estómago	+	+	+	+	-
Bazo	++	+	++++	++	++

**Tabla 9:** Distribución del ARNm de los distintos receptores de somatostatina (SSTR) en el sistema nervioso central (SNC) y en tejidos periféricos: ++++ altamente expresado, +++ muy expresado, ++ moderadamente expresado, + levemente expresado, - no detectado.



#### 4.6. SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES ACOPLADOS A LOS RECEPTORES DE SOMATOSTATINA

La amplia variedad de acciones que presenta la SST, tanto a nivel del SNC como a nivel del SNP, se puede resumir en dos efectos claves:

- ✓ Inhibición de la secreción
- ✓ Inhibición de la proliferación celular

Los sistemas efectores implicados en los efectos antisecretores de la SST incluyen:

- ✓ Inhibición de la enzima AC
- ✓ Estimulación de los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje
- ✓ Inhibición de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje
- ✓ Inhibición de la exocitosis, mediada por el acoplamiento de los SSTR a las vesículas de secreción

En la inhibición de la proliferación celular están involucrados los siguientes efectores:

- ✓ Inhibición de la bomba  $Na^+/H^+$
- ✓ Estimulación de las PTP
- ✓ Regulación de las MAPK

Para que se produzcan todos estos efectos es necesario que la SST se una a sus receptores los cuales, a su vez, se asocian con algún subtipo de proteína G. Un esquema general de los efectores acoplados a los SSTR puede verse en la [Figura 28](#).

##### 4.6.1. Proteínas G

Las proteínas G son las encargadas de acoplar los SSTR a los múltiples efectores regulados por la SST y actúan como interruptores binarios que adquieren diferentes conformaciones dependiendo de la identidad del nucleótido que se une a ellas (Hatley y col., 2003). De este modo, son capaces de pasar de un estado inactivo, cuando están unidas a guanosín 5'-difosfato (GDP), a un estado activo unidas a guanosín 5'-trifosfato (GTP) (McCudden y col., 2005).

Las proteínas G son heterotrímeros, adosados a la cara interna de la membrana plasmática (Gilman, 1987), que están formados por una subunidad  $\alpha$  con actividad GTPasa, una subunidad  $\beta$  y una subunidad  $\gamma$ , codificadas cada una de ellas por distintos genes (Ross, 1989; Offermanns, 2003). La subunidad  $\alpha$ , de la cual existen varios tipos, permite clasificar las proteínas G en cuatro subfamilias llamadas  $G_s$ ,  $G_i/Go$ ,  $G_q$  y  $G_{12}$  (Simon y col., 1991). Por



otro lado, las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  forman un heterodímero al que la subunidad  $\alpha$  se une fuertemente cuando lleva unido GDP (Brandt y Ross, 1985). Se han identificado cinco subtipos de subunidad  $\beta$ , de los cuales  $\beta_5$  es el que se expresa mayoritariamente en el SNC, mientras que se han identificado doce subtipos de la subunidad  $\gamma$ , cuya distribución es bastante heterogénea (Tabla 10) (Schwindinger y Robinshaw, 2001; Offermanns, 2003).

La unión del agonista al receptor provoca un cambio conformacional en éste que activa la proteína G, favoreciendo la salida de GDP y la entrada de GTP a la subunidad  $\alpha$ , que se disocia del complejo  $\beta/\gamma$ . Una vez separadas, ambas partes de la proteína G son capaces de interactuar con distintos efectores celulares.

La actividad GTPasa intrínseca de la subunidad  $\alpha$  es capaz de hidrolizar el GTP a GDP, devolviendo la subunidad  $\alpha$  a su estado inactivo y favoreciendo de nuevo la unión a  $\beta/\gamma$ . No obstante, esta actividad es, en la mayoría de los casos, demasiado débil como para que la hidrólisis del GTP se produzca de manera rápida y es necesaria la intervención de una proteína estimuladora de la actividad GTPasa (GAP, por sus siglas en inglés). Entre todas las GAP, destaca la superfamilia de proteínas reguladoras de la señal de las proteínas G (proteínas RGS) (Arshavsky y Pugh, 1998) y algunas GRK, como la GRK2 (Carman y col., 1999; Sprang y col., 2007). Estas proteínas se unen a la subunidad  $\alpha$  activada e incrementan su capacidad GTPasa, haciendo que la hidrólisis del GTP sea mucho más rápida y favoreciendo así su desactivación y el posterior reensamblaje con la subunidad  $\beta/\gamma$  (Kehrl, 1998; Berman y Gilman, 1998). Puesto que la reasociación del heterotrímero finaliza las interacciones con los efectores (Ford y col., 1998; Wall y col., 1998), se puede decir que las GAP actúan como proteínas finalizadoras de la señalización mediada por proteínas G.

Se ha demostrado que las proteínas  $G\alpha_1$ ,  $G\alpha_2$ ,  $G\alpha_3$  y  $G\alpha_q$  son sensibles a la toxina pertussis (PTX), que, a su vez, bloquea la mayoría de las acciones de la SST (Cronin y col., 1983; Reisine y col., 1985a; Reisine y col., 1985b; Lewis y col., 1986; Yajima y col., 1986). Esto sugiere que las proteínas de la clase  $G\alpha$  o  $G\alpha_q$  realizan un papel específico en la modulación de las acciones de la SST en la célula. Mediante técnicas de inmunohistoquímica, Law y col. (1991) demostraron que los SSTR se acoplan específicamente a las proteínas  $G\alpha_1$  y  $G\alpha_3$  en el cerebro de rata y que, en células AtT-20, estos mismo receptores se acoplan a  $G\alpha_q$ . En un estudio posterior, también se detectó, en el cerebro de rata, la unión de dichos receptores a  $G\alpha_2$  y  $G\alpha_q$  cuando el receptor se encuentra



unido a agonista (Law y col., 1992). Por consiguiente, cuando la SST se une a sus receptores, estos son capaces de acoplarse a  $G\alpha$  y a todos los subtipos de  $G\alpha$ .

Proteínas G	
Tipo	Expresión
<b>Subunidad <math>\alpha</math></b>	
<b>Clase <math>G\alpha_s</math></b>	
$G\alpha_s$	Ubicua
$G\alpha_{sXL}$	Sistema neuroendocrino
$G\alpha_{olf}$	Epitelio olfativo, cerebro
<b>Clase <math>G\alpha_i/o</math></b>	
$G\alpha_i1$	Ampliamente expresada
$G\alpha_i2$	Ubicua
$G\alpha_i3$	Ampliamente expresada
$G\alpha_o$	Neuronas, sistema neuroendocrino
$G\alpha_z$	Neuronas, plaquetas
$G\alpha_{gust}$	Células gustativas
$G\alpha_{t-r}$	Bastones de la retina, células gustativas
$G\alpha_{t-c}$	Conos de la retina
<b>Clase <math>G\alpha_{q/11}</math></b>	
$G\alpha_q$	Ubicua
$G\alpha_{11}$	Ubicua
$G\alpha_{14}$	Riñón, pulmón, bazo
$G\alpha_{15/16}$	Células hematopoyéticas
<b>Clase <math>G\alpha_{12/13}</math></b>	
$G\alpha_{12}$	Ubicua
$G\alpha_{13}$	Ubicua
<b>Subunidad <math>\beta</math></b>	
$\beta_1$	Ampliamente expresada, bastones de la retina
$\beta_2$	Ampliamente expresada
$\beta_3$	Ampliamente expresada, conos de la retina
$\beta_4$	Ampliamente expresada
$\beta_5$	Cerebro
<b>Subunidad <math>\gamma</math></b>	
$\gamma_1, \gamma_{rod}$	Cerebro, bastones de la retina
$\gamma_{14}, \gamma_{cone}$	Cerebro, conos de la retina
$\gamma_2, \gamma_6$	Ampliamente expresada
$\gamma_3$	Cerebro, sangre
$\gamma_4$	Cerebro y tejidos relacionados
$\gamma_5$	Ampliamente distribuido
$\gamma_7$	Ampliamente distribuido
$\gamma_8, \gamma_9$	Ampliamente distribuido
$\gamma_{10}$	Ampliamente distribuido
$\gamma_{11}$	Ampliamente distribuido
$\gamma_{12}$	Ampliamente distribuido
$\gamma_{13}$	Papilas gustativas

**Tabla 10:** Clasificación y expresión de las subunidades de las proteínas G heterotriméricas.



Se ha demostrado que el SSTR1 interacciona con  $G_{i\alpha 3}$  (Kubota y col., 1994), el SSTR2 con  $G_{i\alpha 1-3}$  y con  $G_{o\alpha}$ , mientras que SSTR3 se acopla a  $G_{i\alpha 1}$  y  $G_{i\alpha 3}$  (Yamada y col., 1992; Kagimoto y col., 1994). Aún no existe consenso sobre los subtipos de proteínas G a los que se acopla el SSTR4, aunque sí se sabe que son sensibles a PTX (Patel, 1999; Tulipano y Schulz; 2007). Finalmente, se ha demostrado que el SSTR5 se acopla a  $G_{i\alpha 1-3}$ , a  $G_{\alpha 12}$  y a  $G_{\alpha q}$  (Patel, 1999; Kong y col., 2002). Por lo tanto, un mismo subtipo de receptor es capaz de acoplarse a distintos efectores mediante su interacción con distintas proteínas G (Tabla 11).

Subtipo de receptor	Proteína G	Efectores estimulados	Efectores inhibidos
SSTR1	$G_{i\alpha 3}$	PTP MAPK PLC Receptores AMPA	AC Bomba $Na^+/H^+$ Canales de $Ca^{2+}$
SSTR2	$G_{i\alpha 1-3}$ $G_{o\alpha}$ $G_{\alpha q}$	Canales de $K^+$ PTP PLC	AC Canales de $Ca^{2+}$ MAPK Receptores AMPA
SSTR3	$G_{i\alpha 1}$ $G_{i\alpha 3}$ $G_{\alpha q}$	Canales de $K^+$ PTP PLC MAPK*	AC MAPK*
SSTR4	Sensibles a PTX, se desconoce el subtipo exacto	Bomba $Na^+/H^+$ Canales de $K^+$ MAPK PLC PTP	AC
SSTR5	$G_{i\alpha 1-3}$ $G_{\alpha 12}$ $G_{\alpha q}$	Canales de $K^+$ PTP PLC*	AC Canales de $Ca^{2+}$ MAPK PLC*

**Tabla 11: Sistemas de transducción de señales acoplados a los receptores de somatostatina (SSTR).** AC: adenilato ciclasa; AMPA: ácido  $\alpha$ -amino-2-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; PTP: fosfotirosina fosfatasas; MAPK: proteína quinasas activadas por mitógenos; PLC: fosfolipasa C; PTX: toxina pertussis. \*: En función de la isoforma de efector se ha encontrado tanto inhibición como estimulación. Tomado y modificado de Patel (1999) y Møller y col. (2003).

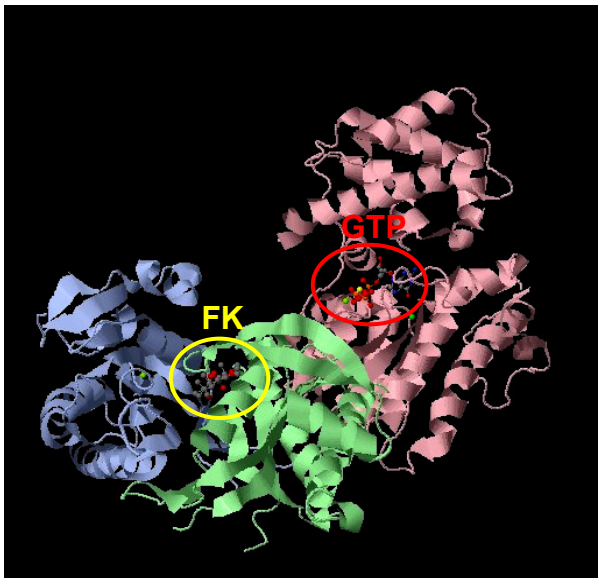




#### 4.6.2. Adenilato ciclasa

La AC es una enzima que convierte el ATP en AMPc, un segundo mensajero que regula un amplio rango de funciones biológicas en la célula. La actividad de esta enzima está controlada, en la mayoría de los casos, por la activación mediante ligando de distintos GPCR y, por tanto, a través de proteínas G (Robison y col., 1968; Sunahara y Taussig, 2002). Hasta la fecha se han descrito nueve isoformas de AC de membrana (ACm) diferentes, denominadas ACI-ACIX, y una isoforma soluble (ACS), que se encuentra en el citosol y en el núcleo y no está regulada por proteínas G (Sunahara y Taussig, 2002; Kamenetsky y col., 2006).

Las nueve ACm poseen una estructura similar, que consiste en un extremo N-terminal variable según la isoforma, un primer dominio transmembrana de seis pasos (TM1) seguido de un lazo citoplasmático que constituye un primer dominio catalítico (C1), otro dominio transmembrana de seis pasos (TM2) y un nuevo dominio citoplasmático catalítico (C2); los dominios C1 y C2 forman el centro activo de la proteína. La ACS, por el contrario, conserva los dominios catalíticos C1 y C2, separados por un pequeño lazo de aproximadamente 20 aminoácidos pero no presenta ningún dominio TM (Kamenetsky y col., 2006).



**Figura 26:** Dominios C1 y C2 de la enzima adenilato ciclasa (en azul y verde) a los que se ha unido una proteína  $G_i$  activa (en rosa). Se destacan el diterpeno forskolina (FK) y el guanósín 5'-trifosfato (GTP).

Al centro catalítico de las ACm se pueden unir distintas proteínas y moléculas para modular su actividad. Una de las moléculas más conocidas es la forskolina (FK), un diterpeno que se extrae del *Coleus forskohlii*, una planta originaria de la India usada en medicina por sus propiedades vasodilatadoras, y que ha demostrado ser uno de los activadores más potentes de las ACm (Seamon y Daly, 1981; Sunahara y Taussig, 2002; Kamenetsky y col., 2006). Entre las proteínas que regulan la actividad de las ACm destacan las proteínas G heterotriméricas. Todos los subtipos de



G $\alpha$ s son capaces de activar todas las isoformas de ACm (Sunahara y col., 1997), mientras que G $\alpha$ i, G $\alpha$ o y G $\alpha$ z inhiben la actividad de las isoformas ACV y ACVI (Taussig y col., 1993). Por otro lado, G $\beta$ / $\gamma$  puede estimular a ACII, ACIV y ACVII e inhibir fuertemente a ACI y ACVIII (Tang y Gilman, 1991; Sunahara y Taussig, 2002). Otra proteína que es capaz de regular la actividad de las ACm es la CaM que, una vez activada por Ca<sup>2+</sup>, estimula las isoformas ACI, ACVIII y, posiblemente, ACIII (Yeager y col., 1985; Choi y col., 1992; Cali y col., 1996; Kamenetsky y col., 2006). Por último, se ha demostrado que determinadas proteínas quinasas, como la PKA, la PKC o la CaMK, pueden igualmente activar o inhibir las ACm. La PKA, por ejemplo, inhibe las isoformas ACV y ACVI (Iwami y col., 1995, Sunahara y Taussig, 2002) mientras que la PKC activa a ACI, ACII, ACIII, ACV y ACVII e inhibe a ACIV y ACVI. Por otro lado, se ha comprobado que la CaMK inhibe la ACI y la ACIII (Tabla 12) (Sunahara y Taussig, 2002; Kamenetsky y col., 2006).

El Ca<sup>2+</sup> también es capaz de regular la actividad AC. Se ha demostrado que concentraciones milimolares (no fisiológicas) de Ca<sup>2+</sup> pueden inhibir todos los subtipos de ACm existentes. Sin embargo, en el rango micromolar, sólo se inhiben los subtipos V y VI. Este hecho resulta lógico si se tiene en cuenta que estos dos subtipos están restringidos a membranas de células excitables y que se encuentran compartimentalizados con canales de Ca<sup>2+</sup> (Sunahara y Taussig, 2002). La ACs, por el contrario, responde de manera diferente a la presencia de Ca<sup>2+</sup> y se ha demostrado, *in vitro*, que este ión es capaz de estimular esta isoforma (Tabla 12) (Jaiswal y Conti, 2003).

La ACs, por otro lado, no parece estar regulada por ninguna proteína de las descritas anteriormente ni responde a la FK. Sin embargo, se ha demostrado que esta isoforma se encuentra activada específica- y directamente por bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), ya que este anión induce un cambio conformacional en la ACs que facilita la catálisis del ATP y el paso a AMPc (Kamenetsky y col., 2006). La presencia de ACs en el citoplasma y núcleo celulares y su activación por bicarbonato sugieren que esta isoforma puede mediar en la respuesta al metabolismo celular, cambios de pH y flujos iónicos, ya que el sistema CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es el principal tampón fisiológico y su estado es un indicativo de la homeostasis celular (Ko y Paradise, 1970; 1971; Monteil y col., 1995; Zippin y col., 2001).



Isoforma	Distribución	Regulación			Función
		Proteínas G	Quinasas	Calcio/Otros	
ACI	Cerebro Médula adrenal	↑↑ Gαs ↓↓ Gβ/γ ↓↓ Gαo	↑ PKC ↓↓ CaMKIV	↑↑ Ca <sup>2+</sup> -CaM	Aprendizaje, memoria, LTP, plasticidad sináptica
ACII	Cerebro, músculo esquelético, pulmón y corazón	↑↑ Gαs ↑↑ Gβ/γ	↑↑ PKC	-	-
ACIII	Cerebro y epitelio olfativo	↑↑ Gαs	↑ PKC ↓↓ CaMKII	↑↑ Ca <sup>2+</sup> -CaM	Olfato
ACIV	Cerebro, corazón, riñón, pulmón, útero	↑↑ Gαs ↓↓ Gβ/γ	↓ PKC	-	-
ACV	Cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, útero y glándula adrenal	↑↑ Gαs ↓↓ Gβ/γ ↓↓ Gαi	↓↓ PKA ↑↑ PKC	↓↓ Ca <sup>2+</sup>	-
ACVI	Ubicua	↑↑ Gαs ↓↓ Gβ/γ ↓↓ Gαi	↓↓ PKA ↓↓ PKC	↓↓ Ca <sup>2+</sup>	-
ACVII	Ubicua, altamente expresada en cerebro	↑↑ Gαs ↑↑ Gβ/γ	↑↑ PKC	-	Dependencia a las drogas
ACVIII	Cerebro, pulmón, testículos, útero, corazón y glándula adrenal	↑↑ Gαs	-	↑↑ Ca <sup>2+</sup> -CaM	Aprendizaje, memoria, LTP, plasticidad sináptica
ACIX	Cerebro, músculo esquelético	↑↑ Gαs	-	-	-
ACs	Ubicua, altamente expresada en testículos	No regulada por proteínas G	-	↑ Ca <sup>2+</sup> ↑↑ HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Maduración del esperma

**Tabla 12: Distribución, regulación y función de las distintas isoformas de adenilato ciclasa (AC).** ACs: adenilato ciclasa soluble; CaM: Calmodulina; CaMK: quinasa dependiente de CaM; LTP: potenciación a largo plazo; PKA: proteína quinasa A; PKC; proteína quinasa C; ↑↑: estimulada; ↑: levemente estimulada; ↓↓: inhibida; ↓: levemente inhibida. Modificado de Sunahara y Taussig (2002).

A principios de la década de 1980, se observó que la SST inhibía la formación de AMPc en el cerebro, la hipófisis, el páncreas y en células entéricas (van Calker y col., 1980) y, posteriormente, se demostró que dicha inhibición está mediada por proteínas Gi sensibles a PTX. Las primeras investigaciones encaminadas a determinar qué subtipo de SSTR se encontraba implicado en esta inhibición revelaron que los subtipos SSTR2, SSTR3 y SSTR4



disminuyen la formación de AMPc, principalmente a través de  $G\alpha 1$  (Yasuda y col., 1992; Rens-Domiano y col., 1992). Posteriormente se demostró que todos los SSTR se acoplan negativamente a las ACm a través de distintas subunidades de proteínas Gi (Patel, 1999).

#### **4.6.3. Canales de potasio**

Los canales de  $K^+$  se acoplan a los SSTR a través de una proteína G denominada inicialmente  $G_K$  pero cuya caracterización posterior reveló que se trataba de  $G\alpha 3$  (Yatani y col., 1990). Estudios posteriores realizados por Kozasa y col. (1996) demostraron que, en la línea celular de hipófisis AtT-20, la SST era capaz de estimular los canales de  $K^+$  mediante  $G\alpha 2$ . Por ello, hasta la fecha, se cree que estas subunidades de proteínas G son las que están implicadas en la activación de los canales de  $K^+$  inducida por SST. La apertura de estos canales provoca la salida de iones  $K^+$  desde el interior celular al exterior. Este movimiento de iones conduce a una hiperpolarización de la membrana plasmática y a una reducción secundaria de los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ , ya que esta hiperpolarización impide la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. A su vez, la disminución de  $Ca^{2+}$  intracelular inhibe a la CaM y a la PKC, lo que conduce a una inhibición en los procesos secretores. La acción hiperpolarizante de la SST, estudiada sobre todo en neuronas del hipocampo y del núcleo del tracto solitario, se atribuye a la activación de una corriente de  $K^+$  dependiente de voltaje denominada corriente M ( $I_M$ ), bloqueada por agonistas muscarínicos (Jacquin y col., 1988; Moore y col., 1988). Asimismo, se ha sugerido la existencia de una vía alternativa a través de la cual la SST activa los canales de  $K^+$  de forma indirecta. Dicha activación está mediada por la  $PLA_2$ , una enzima que induce la producción de ácido araquidónico y leucotrienos a partir de los fosfolípidos de membrana y que se activa por la SST a través de una proteína Gi. Se ha observado que ambos metabolitos estimulan los canales de  $K^+$  en neuronas hipocampales y en células hipofisarias de rata (Schweitzer y col., 1990; Alderton y col., 2001).

Varios estudios se han centrado en analizar el subtipo de SSTR que se acopla a los canales de  $K^+$ . En primera instancia, se postuló que los subtipos SSTR2 y SSTR3 eran los únicos que estimulaban dichos canales, puesto que se ha demostrado que están acoplados a  $G\alpha 3$  (Yatani y col., 1990). No obstante, experimentos posteriores han permitido demostrar que todos los subtipos, a excepción del SSTR1, que media la inhibición de los canales de  $K^+$ , son capaces de activar dichos canales (Kreienkamp y col., 1997).



#### **4.6.4. Canales de calcio**

Además del efecto indirecto de la SST en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  descrito en el apartado anterior, diversos estudios sugieren que los SSTR pueden inhibir directamente la entrada de este catión a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Reisine (1995) demostró que la SST, actuando a través de sus receptores, bloquea la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por un agonista de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , el Bay-K-8644, en células AtT-20. Este efecto está mediado por una proteína G sensible a PTX, lo que sugiere que los SSTR se acoplan directamente a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en esta línea celular hipofisaria.

Los estudios electroforéticos de Kleuss y col. (1991) revelaron que la proteína  $\text{Go}\alpha$  acopla selectivamente los SSTR a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y, según el trabajo de Law y Reisine (1992), el SSTR2 interacciona selectivamente con  $\text{Go}\alpha$ . Además, se ha demostrado que agonistas específicos del SSTR2, como el MK-678, inhiben la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en células de cultivo embrionarias como en la línea celular AtT-20, por lo que parece que este subtipo de SSTR se encuentra acoplado a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tallent y col., 1996). Por otro lado, se ha observado que el BIM-23052, un agonista selectivo del SSTR5, también inhibe los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en células AtT-20 (Tallent y col., 1996) y se ha demostrado que el SSTR1 es capaz de inhibir estos canales en células  $\text{GH}_{12}\text{C}_1$  de hipófisis de rata (Chen y col., 1997).

La inhibición de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la unión de la SST a sus receptores no sólo se produce de forma directa. Se ha demostrado que la PKA es capaz de fosforilar estos canales y activarlos. Dado que la SST induce una disminución en los niveles intracelulares de AMPc, a través de la inhibición de la AC, que conduce a una menor activación de la PKA, el resultado final es una menor fosforilación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y, por tanto, una inhibición de los mismos (Tsien y col., 1986).

#### **4.6.5. Vesículas de secreción**

Se ha observado que la SST bloquea la secreción de hormonas estimuladas directamente por varios segundos mensajeros, como el AMPc, el  $\text{IP}_3$  o el DAG, o por la elevación de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos hallazgos indican que la SST, independientemente de su efecto sobre el AMPc, el  $\text{Ca}^{2+}$  o cualquier otro segundo mensajero, es capaz de inhibir la secreción hormonal mediante un efecto distal sobre el proceso de exocitosis. El mecanismo por el cual la SST inhibe este proceso es dependiente de GTP y



sensible a PTX, lo que sugiere que existe una proteína G, denominada  $G_e$ , junto al lugar donde se produce la exocitosis, que se encuentra acoplada a los SSTR (Luini y De Matteis, 1990). Recientemente, se ha observado que esta inhibición de la exocitosis vía  $G_e$  y dependiente de de SST se produce mediante la activación de la calcineurina (Gromada y col., 2001). Hasta hace poco, se desconocía qué subtipo de SSTR estaba implicado en la activación de esta proteína fosfatasa y posterior inhibición de la exocitosis, pero se ha demostrado que el subtipo SSTR2 podría mediar en dicha inhibición (Strowski y col., 2000; Kramer y col., 2005).

#### **4.6.6. Bomba $Na^+/H^+$**

Se ha demostrado que la SST, a través de su receptor SSTR1, es capaz de inhibir la bomba de  $Na^+/H^+$ , en células entéricas endocrinas caninas, produciendo una acidificación del medio intracelular (Barber y col., 1989; Hou y col., 1994). Este efecto se produce de manera independiente a proteínas G sensibles a PTX y conduce a la inhibición de serina/treonina quinasas, con la consiguiente defosforilación y desactivación de los sustratos de dichas enzimas, que están implicados en acontecimientos mitogénicos tempranos. No existe consenso sobre si el SSTR2 se acopla a la bomba de  $Na^+/H^+$ , ya que parecen existir diferencias según el tipo celular estudiado (Chen y Tashjian, 1999; Møller y col., 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos por Smalley y col. (1998) sugieren que el subtipo SSTR4 podría estimular la bomba de  $Na^+/H^+$  de una manera dependiente de proteínas  $G_i/G_o$  sensibles a PTX.

#### **4.6.7. Fosfotirosina fosfatasas**

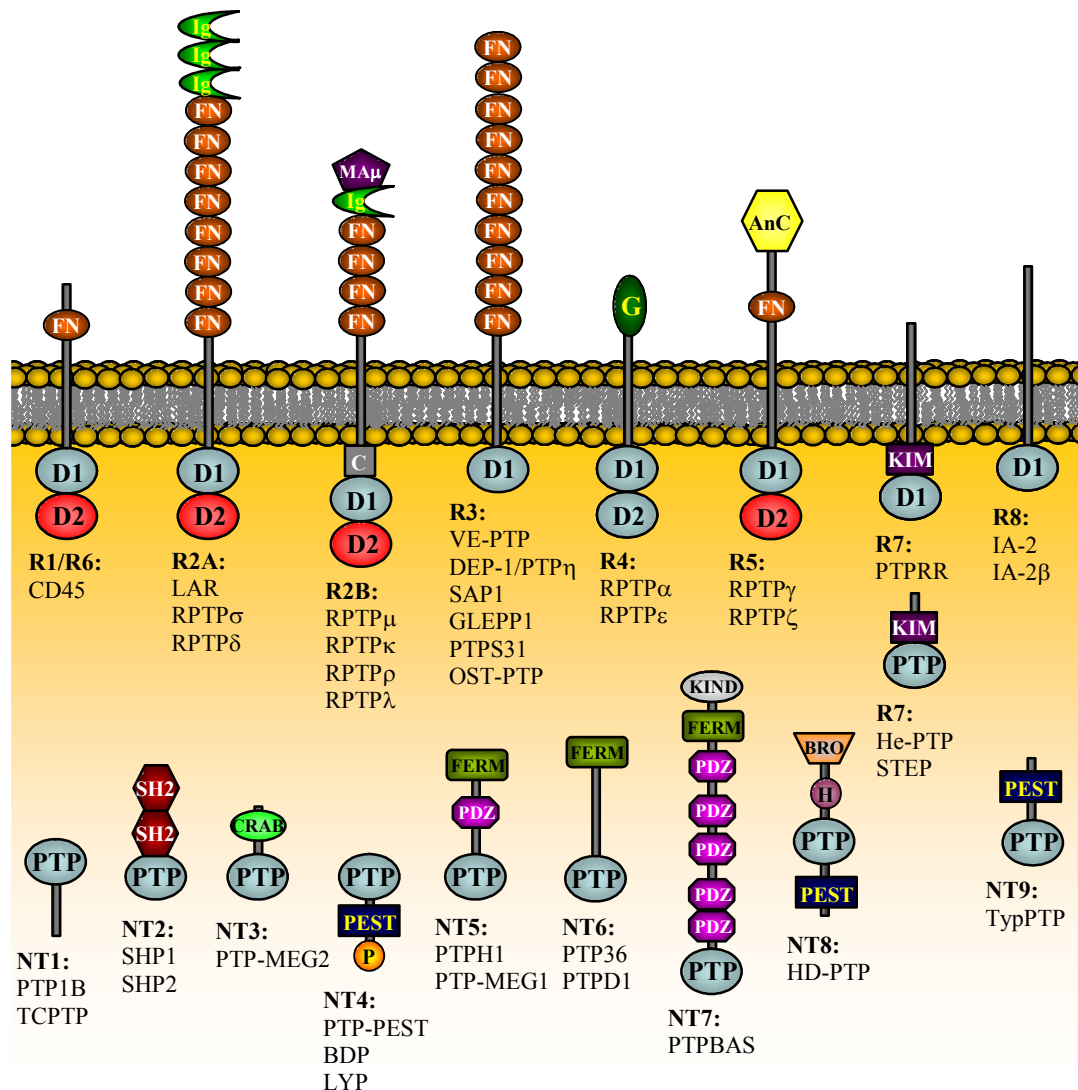
Se ha demostrado que la activación de los SSTR tienen efectos citostáticos y provoca la detención del ciclo celular en G1 y que algunos análogos de la SST inducen apoptosis en células tumorales (Weckbecker y col., 2003). A pesar de que se han encontrado numerosas vías que podrían justificar estos efectos, en la actualidad se sabe que la mayoría de los efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos de la SST están mediados por las PTP (Florio, 2008a). Estas enzimas son capaces de defosforilar y desactivar otras proteínas, como las tirosina quinasas (PTK, por sus siglas en inglés), las MAPK e, incluso, receptores de membrana, como los receptores AMPA (Moult y col., 2006; Hendriks y col., 2008), por lo que participan en la regulación de numerosas actividades celulares tales como la motilidad, el metabolismo o los procesos de diferenciación, crecimiento y proliferación y muerte celular



(Hallé y col., 2007). La capacidad de las PTP para reaccionar con sustratos fosforilados reside en la cisteína presente en el motivo [HCXXGXXR], altamente conservado, que es la seña de identidad de estas enzimas. Dicho motivo se repite a lo largo de un dominio catalítico de aproximadamente 280 aminoácidos que constituye el centro activo de las PTP (Tonks, 2006; Hallé y col., 2007; Florio, 2008b). El hecho de que la actividad de estas enzimas dependa de estos residuos de cisteína ocasiona que las PTP sean sensibles a la oxidación. Recientemente, se ha demostrado que muchas isoformas sufren oxidaciones reversibles que anulan su actividad en respuesta a factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y estrés oxidativo (Tonks, 2005)

De esta superfamilia de proteínas, se han identificado, en humanos, más de 107 tipos diferentes que incluyen 38 PTP llamadas “clásicas” (Tonks, 2006) que defosforilan en residuos de tirosina, y en torno a 65 llamadas PTP “no clásicas”, que son capaces de defosforilar, además, en residuos de treonina/serina (Alonso y col., 2004; Tonks, 2006; Florio, 2008b). Las PTP clásicas se subdividen, a su vez, en diez subfamilias de PTP citosólicas y 8 subfamilias de PTP similares a receptor (RPTP, por sus siglas en inglés) (Figura 27). Las PTP citosólicas se caracterizan por tener un único dominio catalítico flanqueado por distintos dominios reguladores, que confieren a estas fosfatasa una localización subcelular restringiendo su actividad a regiones específicas de la célula; además, controlan su actividad por interacción directa con el dominio catalítico o regulando la afinidad por el sustrato (Florio, 2008b). Por otro lado, las RPTP se caracterizan por tener un dominio transmembrana corto, que las mantiene ancladas a la membrana plasmática, y un extremo extracelular variable similar a inmunoglobulina o a fibronectina de tipo III, que podría otorgarles capacidad de interacción con la matriz extracelular. La mayor parte de las RPTP poseen, en su extremo citosólico, dos dominios catalíticos, uno proximal a la membrana plasmática (D1) y otro distal (D2), que suele estar inactivo y cuya función se desconoce, aunque parece estar implicado en la formación de dímeros y en la interacción con otras proteínas (Figura 27) (Pan y col., 1993; Tonks y Neel, 2001; Florio, 2008a; 2008b).





**Figura 27: Esquema descriptivo y clasificación de las fosfotirosina fosfatasas (PTP) clásicas.** R1-R8: Subfamilias de PTP similares a receptor (RPTP); NT1-NT9: subfamilias de PTP citosólicas. Nótese que la subfamilia R7 incluye también dos formas citosólicas que se generan por procesamiento alternativo. Abreviaturas de los dominios; BRO: homología con los marcos de lectura abiertos de baculovirus; AnC: similar a anhidrasa carbónica; C: similar a cadherina; CRAB: similar a la proteína celular de unión al ácido retinoico; D1 y D2: dominios proximal y distal de las RPTP (en rojo se señala el dominio inactivo); FERM: homología con la banda 4,1/exina/radixina/moesina; FN: similar a fibronectina de tipo III; G: dominio glicosilado; H: dominio rico en histidina; Ig: similar a inmunoglobulina; KIM: motivo de interacción con quinasas; KIND: similar al extremo N-terminal de quinasas; MA $\mu$ : homología a membrina/A2/RPTP $\mu$ ; PDZ: homología a PDZ (PSD-95/DSL/ZO1); Pro: secuencia rica en prolina; SH2: homología con quinasas Src. Modificado de Florio (2008) y Hendriks y col. (2008).





De todas las PTP identificadas hasta la fecha, al menos tres de ellas, SHP1, SHP2 y PTP $\eta$  (DEP-1 en humanos), han demostrado estar implicadas directamente en los efectos antiproliferativos de la SST (Florio, 2008b). SHP1 es el estereotipo de una PTP clásica y es una de las más estudiadas en relación con la SST. Esta enzima citosólica presenta dos dominios reguladores SH2 (dominios de homología con quinasas Src) cuya función es, por un lado, reconocer y reclutar sustratos fosforilados en residuos de tirosina y, por otro, regular la actividad fosfatasa de la enzima. En ausencia de sustrato, el dominio SH2 N-terminal se une al dominio catalítico de SHP1 y lo desactiva, mientras que, en presencia de un sustrato fosforilado adecuado, SH2 interactúa con éste y deja libre el centro activo de la fosfotirosina fosfatasa (Tonks y Neel, 2001). Se ha demostrado que la activación de SHP1 por la SST detiene la proliferación celular en numerosas líneas celulares tumorales (Thangaraju y col., 1999a; Zapata y col., 2002; Theodoropoulou y col., 2006; Florio, 2008b) y que dicha activación está mediada por proteínas G sensibles a PTX (Pan y col., 1992). Aunque se postula que todos los SSTR pueden acoplarse a SHP1, se ha comprobado, mediante estudios de inmunoprecipitación, que los subtipos SSTR2 y SSTR3 son los que se acoplan preferentemente a esta PTP. En la línea celular CHO, por ejemplo, se ha demostrado que SSTR2 forma un complejo con SHP1 y G $\alpha$ 3 (López y col., 1997) y que la unión de la SST a su receptor produce la activación de SHP1 y su posterior disociación del complejo. En esta misma línea celular, se ha demostrado que SSTR3 puede inducir apoptosis por un mecanismo dependiente de SHP1 (Sharma y col., 1996). En otras líneas celulares y tejidos, se ha comprobado que para inducir el proceso de muerte celular programado es necesario, además, la acidificación del medio intracelular mediante un mecanismo que involucraría a otros SSTR y a la bomba de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, que activaría las caspasas efectoras (Thangaraju y col., 1999b; Liu y col., 2000; Møller y col., 2003; Florio, 2008b).

Por otro lado, se ha demostrado que SHP2 está implicada en los efectos antiproliferativos de la SST mediados por SSTR1 (Florio y col., 1999; 2000), SSTR2, SSTR3 y SSTR4 (Reardon y col., 1997). Esta fosfatasa es estructuralmente muy similar a SHP1 pero presenta características funcionales muy diferentes a ésta. Se ha demostrado, por ejemplo, que SHP2 puede tener también un efecto proliferativo en algunos tejidos ya que se acopla a receptores de factores de crecimiento y puede eliminar el fosfato C-terminal inhibitorio presente en las PTK de la familia Src y activarlas, aumentando de este modo la proliferación celular (Ostman y col., 2006). Sin embargo, en respuesta a la activación de los



SSTR, SHP2 produce una inhibición del ciclo celular por dos vías alternativas dependientes de MAPK. La activación de SSTR1 y SSTR2 en células CHO, por ejemplo, disminuye la proliferación a través de una activación de las MAPK. Este efecto se atribuye a una activación de SHP2 a través de PI3K, que se activa a su vez por la subunidad  $\beta/\gamma$  de las proteínas G sensibles a PTX. SHP2 es capaz de activar las quinasas Src y la vía de Ras/Raf/MEK/ERK de una manera sostenida en el tiempo, lo que conduce a un aumento en la expresión de dos inhibidores de ciclo celular denominados p21<sup>cip1/waf1</sup> y p27<sup>kip1</sup> (Florio y col., 1999; Lahlou y col., 2003). En la línea NIH3T3 transfectadas con SSTR2, SSTR3 y SSTR4 se ha demostrado que la SST activa SHP2 y que, ésta, a su vez, desactiva Raf1 y bloquea la cascada de MAPK, produciendo una parada del ciclo celular (Dent y col., 1997; Reardon y col., 1996; Florio, 2008b).

A pesar de que la mayoría de los estudios sobre los efectos antiproliferativos de la SST se han centrado en SHP1 y SHP2, se ha descubierto recientemente la implicación de una RPTP llamada PTP $\eta$ /DEP-1. Esta RPTP está expresada de forma ubicua en el organismo, con altos niveles en el cerebro, el hígado y el bazo (Florio, 2008b). Se ha demostrado que en determinadas líneas celulares, como PC-C13, la SST induce parada de ciclo celular en G1 a través de la sobreexpresión del factor p27<sup>kip1</sup>. Cuando esta línea celular se transforma activando determinados oncogenes, se produce una pérdida progresiva de PTP $\eta$ /DEP-1, pero no de SHP2, que produce una resistencia al tratamiento con SST (Florio y col., 1997; 2001). La reexpresión de PTP $\eta$ /DEP-1 en estas células restaura su sensibilidad a la SST (Florio y col., 2001). En otras líneas celulares que carecen de esta RPTP, la SST puede detener el ciclo celular si se transfectan las células con PTP $\eta$ /DEP-1 mientras que, por el contrario, cuando se transfectan con un mutante negativo de esta misma RPTP, las células se vuelven resistentes a la SST (Massa y col., 2004). Estos efectos de PTP $\eta$ /DEP-1 sobre el ciclo celular se han atribuido a su capacidad para defosforilar directamente a ERK y desactivarlo (Massa y col., 2004; Arena y col., 2007; Florio, 2008b).

Recientemente, se ha propuesto un modelo de activación de PTP denominada “complejos multiefectores”. Así, se ha demostrado que la activación de estas fosfatasa depende del grado de fosforilación de las mismas y, por tanto, podría involucrar a otras proteínas, como las PTK (López y col., 1997; Florio 2008b). Se ha demostrado en diferentes líneas celulares que dos PTK, Jak2 y Src, son necesarias para la activación, vía SST y



proteínas G, de SHP1, SHP2 y PTP $\eta$ /DEP-1 (Ferjoux y col., 2003; Hortala y col., 2003). Por lo tanto, se postula que los efectos citostáticos de la SST dependen de la existencia de complejos proteicos y de una cascada de fosforilaciones y defosforilaciones sucesivas que culminaría con la activación de dos PTP finales, SHP1 y PTP $\eta$ /DEP-1. Según este modelo, SSTR1, por ejemplo, estaría formando un complejo con una proteína Gi, que activaría Jak2, que fosforilaría y activaría a SHP2. Ésta, a su vez, defosforilaría y activaría a Src, que, por último, activaría a PTP $\eta$ /DEP1. Por otro lado, SSTR2 se acoplaría positivamente a Jak2 y a Src a través de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta/\gamma$ , respectivamente, de las proteínas Gi; Jak2 es capaz de activar a SHP1 y Src es capaz de activar a SHP1 y SHP2. Las PTP citosólicas, una vez activas, se disocian del complejo y son capaces de defosforilar distintas proteínas citosólicas, como las MAPK, inhibiendo así el ciclo celular (López y col., 1997; Ferjoux y col., 2003; Arena y col., 2007; Florio, 2008a; 2008b).

#### **4.6.8. Fosfolipasas**

La PLC es otro efector acoplado a los SSTR. Hasta el momento, se han identificado diez isoformas de PLC (Rhee y Choi, 1992; Lynn y Hughes, 2000). Esta enzima juega un papel importante en la mediación de las acciones celulares de muchas hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, como la dopamina, la adenosina o la SST. La activación de la PLC produce la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) y la generación de los segundos mensajeros IP<sub>3</sub> y DAG. El IP<sub>3</sub> se une a sus receptores intracelulares específicos, situados en depósitos de Ca<sup>2+</sup> no mitocondriales, produciendo una liberación de Ca<sup>2+</sup>. El DAG, junto con el Ca<sup>2+</sup>, es el activador endógeno de la PKC, que, a su vez, puede activar la bomba de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Berridge, 1993; Møller y col., 2003).

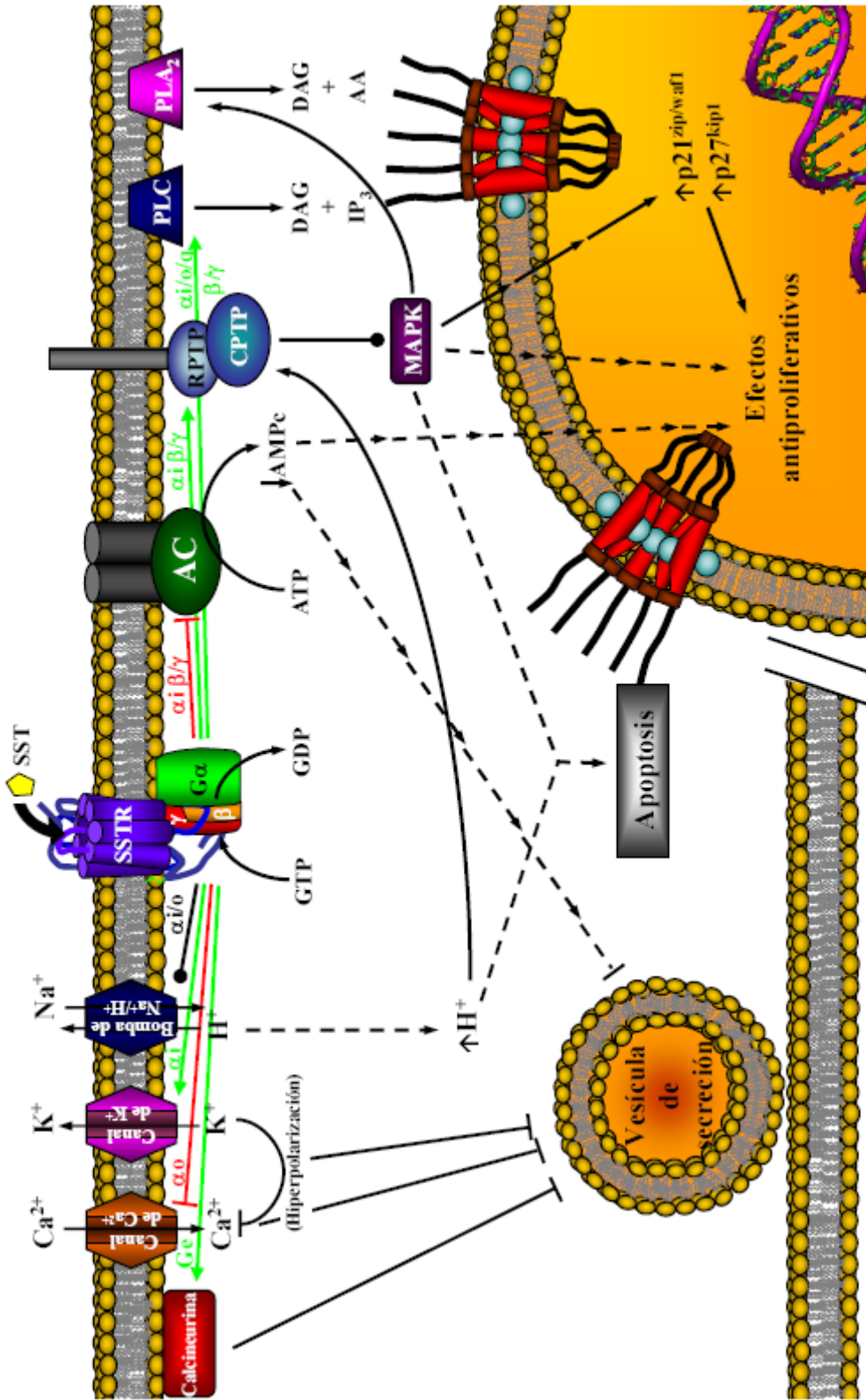
La mayoría de los investigadores han encontrado que, en el cerebro, la SST provoca un aumento en los niveles de IP<sub>3</sub> mientras que en otros tejidos, como los islotes pancreáticos, se ha observado el efecto contrario (Malm y col., 1991). Lachowicz y col. (1994) y Muñoz-Acedo y col. (1995) demostraron que la SST aumenta la concentración de IP<sub>3</sub> en homogeneizados de hipófisis, hipocampo y corteza cerebral. También se ha observado que la SST provoca una movilización de Ca<sup>2+</sup> en cultivos de células que expresan SSTR nativos, como son los astrocitos procedentes de estriado (Delumeau y col., 1992).

Existe cierta controversia acerca de qué tipo de proteína G es la encargada de acoplar los SSTR a la PLC ya que se han encontrado diferencias según las líneas celulares



estudiadas. Así, Kubota y col. (1994) comprobaron que, en células CHO, la SST aumenta los niveles de  $IP_3$  y que este efecto se revierte por PTX (Kubota y col., 1994). Estos mismos autores proponen que es la subunidad  $\beta/\gamma$  la que acopla los SSTR a la PLC, un hecho que también ha sido comprobado por Murthy y col. (1996) en células intestinales de músculo liso. Por otro lado, se ha comprobado que todos los SSTR humanos transfectados en células COS-7 son capaces de mediar la activación de la PLC por un mecanismo sensible a la PTX cuando son expuestos a bajas concentraciones de SST (Tomura y col., 1994). A altas dosis del péptido, sin embargo, los subtipos SSTR2, SSTR3 y SSTR5 son capaces de estimular la PLC de un modo insensible a PTX. Además, Siehler y Hoyer (1999), comprobaron que la SST-14, en células CCL-39, estimula la formación de  $IP_3$  y el aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular a través de los receptores SSTR3 y SSTR5 y que la PTX revierte sólo parcialmente este aumento. Estos mismos autores comprobaron que el resto de los subtipos de receptores, en esta línea celular, apenas es capaz de estimular la PLC. En conjunto, todos estos resultados significan que los cinco subtipos pueden acoplarse a la PLC a través de proteínas Gi/Go sensibles a PTX y del dímero  $\beta/\gamma$ ; sin embargo, en algunos tejidos o líneas celulares, los subtipos SSTR2, SSTR3 y SSTR5 pueden también acoplarse a proteínas Gq para activar la PLC.

Por otro lado, se ha comprobado que la SST, a través de sus receptores, también puede activar la  $PLA_2$  y aumentar los niveles de AA en neuronas hipocámpales y astrocitos (Shimizu y col., 1996; Møller y col., 2003). En células CHO-K1, se ha demostrado que el subtipo SSTR4 estimula la  $PLA_2$  de forma sensible a la PTX y por un mecanismo que implica la activación de las MAPK (Marin y col., 1991; Møller y col., 2003). El modelo que se propone es el siguiente: la SST activa sus receptores y, éstos, a las proteínas G heterotriméricas, las proteínas G activan las MAPK y éstas, a su vez, activan la  $PLA_2$ , que conduce a un aumento en los niveles de DAG y AA (Marin y col., 1991; Møller y col., 2003). Puesto que el AA, junto al  $IP_3$ , participa en numerosos procesos fisiológicos, como la proliferación y diferenciación celular, la inflamación o el aprendizaje y memoria, este hecho otorga a la SST un papel regulador adicional en dichos procesos.



**Figura 28: Efectos antiproliferativos, antisecretores y proapoptóticos de la somatostatina (SST) a través de sus receptores (SSTR).** Desde el receptor parten flechas hacia los distintos efectores estimulados (flechas verdes), inhibidos (flechas rojas) o efectores que, en función de la isoforma pueden ser estimulados o inhibidos (flechas negras terminadas en círculo). También se indica la isoforma de proteína G que media en dicha estimulación o inhibición. Desde los efectores parten, a su vez, líneas continuas que indican un efecto directo o líneas discontinuas indican un efecto postulado. Las flechas acabadas en punta indican estimulación y las acabadas en línea inhibición. Las flechas consecutivas indican un efecto mediado por proteínas intermedias. AA: Ácido araquidónico; AC: Adenilato ciclasa; AMPc: adenosin 3',5'-monofosfato cíclico; ATP: adenosin 5'-trifosfato; CPTP: fosfotirosina fosfatasa citosólica; DAG: Diacilglicerol; GDP: guanósina 5'-difosfato; GTP: guanósina 5'-trifosfato; IP $_3$ : Inositol 1,4,5-trifosfato; PLA $_2$ : fosfolipasa A $_2$ ; PLC: fosfolipasa C; RPTP: fosfotirosina fosfatasa de tipo transmembrana;

## Objetivos

“El experimentador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo que encuentra”.  
[Claude Bernard]





## **OBJETIVOS**

Las vitaminas A y E son moléculas liposolubles esenciales que participan en el mantenimiento de numerosas funciones vitales y cuyo déficit genera graves trastornos en el organismo. Entre sus acciones destacan la regulación de la expresión génica, de la actividad enzimática y de diversos sistemas de transducción de señales (Debier y Larondelle, 2005). La VA ha demostrado ser, además, un cofactor de determinadas proteínas mientras que la VE es un eficaz antioxidante, capaz de eliminar radicales libres y ERO (Debier y Larondelle, 2005; Lane y Bailey, 2005; Zingg, 2007c). Ambas vitaminas participan también en la regulación de la diferenciación, la proliferación y la muerte celular. Recientes investigaciones han demostrado la implicación de estas vitaminas en el aprendizaje y la memoria, dos procesos asociados a la formación hipocampal (Giap y col., 2000). Así, se ha observado que en ratas y ratones, la deficiencia de VA genera fallos en la memoria espacial que revierten tras la administración de dicha vitamina o su restitución en la dieta (Cocco y col., 2002; Etchamendy y col., 2003) y que el tratamiento con VE ayuda a paliar las pérdidas de memoria y los trastornos cognitivos asociados a la edad (Monji y col., 1994; Socci y col., 1995).

Está ampliamente descrito que la SST, un neuropéptido con funciones de neurotransmisor y neuromodulador, juega un papel importante en la regulación de los procesos cognitivos y de la proliferación celular. Se ha observado, por ejemplo, que la depleción de la SST inducida mediante la administración de cisteamina en el hipocampo genera trastornos en el aprendizaje espacial mientras que la inyección del neuropéptido en esta área cerebral facilita las funciones cognitivas (Matsuoka y col., 1991; Guillou y col., 1998). Además, se ha descrito que la SST, a través de sus receptores específicos, es capaz de activar los receptores colinérgicos muscarínicos de las células granulares del GD y facilitar las LTP hipocampales (Pittman y Siggins, 1981; Leranthy y Frotscher, 1987; Scharfman y Schawartzkroin, 1988; Matsuoka y col., 1991), proceso fisiológico que se considera la base molecular de la memoria. Por otro lado, se ha demostrado que la supervivencia neuronal se encuentra regulada por los niveles intracelulares de AMPc y la actividad de las PTP, moléculas que son moduladas por la SST (Patel et al., 1994; Dutar y col., 2002; Baratta y col., 2002; Barco y col., 2006; Tomimatsu y Arakawa, 2008).



En el momento actual se desconoce si el sistema somatostatinérgico está implicado en el mecanismo de acción de las vitaminas A y E. Sin embargo, el hecho de que ambas vitaminas liposolubles y el sistema somatostatinérgico regulen los procesos cognitivos y la supervivencia neuronal nos sugiere dicha posibilidad. Por ello, en el presente trabajo nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1- Evaluar los efectos de la deficiencia de VA y de la administración de TTR sobre la vía de señalización de la SST en el hipocampo de la rata adulta**
- 2- Valorar la posible implicación del estrés oxidativo en las alteraciones del sistema somatostatinérgico inducidas por la deficiencia de VA o la administración de TTR en el hipocampo de la rata adulta**
- 3- Valorar los efectos de la deficiencia de VE y del tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol sobre la vía de señalización de la SST en el hipocampo de la rata adulta**
- 4- Valorar los posibles efectos de las vitaminas A y E sobre la supervivencia neuronal en el hipocampo de la rata adulta**

Para abordar dichos objetivos, analizamos los principales componentes de la vía de transducción de señales de la SST valorando los siguientes parámetros:

1. La expresión del gen de la SST mediante la determinación de:
  - 1.1. Los niveles tisulares de SST-IR mediante radioinmunoanálisis (RIA)
  - 1.2. Los niveles de ARNm de la SST mediante RT-PCR
  - 1.3. Los niveles proteicos de la prohormona convertasa 2 mediante inmunoblot
2. La funcionalidad y expresión de los SSTR mediante la determinación de:
  - 2.1. Los parámetros de equilibrio de la unión de la  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST-14}$  a los receptores específicos de SST
  - 2.2. La expresión de los subtipos SSTR1-SSTR4 a nivel del ARNm mediante PCR a tiempo real
  - 2.3. La expresión proteica de los subtipos SSTR1-SSTR4 mediante inmunoblot





- 2.4. La expresión proteica de GRK2, GRK5 y GRK6 mediante inmunoblot
3. La vía de la AC mediante la determinación de:
  - 3.1. La actividad AC basal y estimulada por FK
  - 3.2. La capacidad de la SST para inhibir la actividad AC
  - 3.3. La expresión proteica de las isoformas ACI, ACV/VI y ACVIII mediante inmunoblot
  - 3.4. Los niveles proteicos de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de las proteínas Gi mediante inmunoblot, así como su funcionalidad
  - 3.5. La fosforilación de CREB mediante inmunoblot
4. La vía de las PTP:
  - 4.1. La actividad de las PTP
  - 4.2. La expresión proteica de SHP1 y PTP $\eta$  mediante inmunoblot
  - 4.3. La fosforilación de ERK1/2 mediante inmunoblot

Asimismo, analizamos el estado de las defensas antioxidantes valorando:

1. Los niveles de peroxidación lipídica mediante el análisis de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
2. La actividad SOD por el método de Minami y Yoshikawa (1979)
3. La actividad CAT por el método de Aebi y col. (1984)
4. Los niveles de GSH y GSSG según el método de Griffith (1980)

Por último, el estudio de la supervivencia neuronal se hizo mediante:

1. La tinción *in situ* de núcleos apoptóticos de hipocampo con la técnica del TUNEL
2. La determinación de la fosforilación de Akt/PKB, ERK1/2 y JNK/SAPK mediante inmunoblot

## *Materiales y Métodos*

“No hay nada imposible, porque los sueños de ayer son las esperanzas de hoy y pueden convertirse en realidad mañana”.

[Anónimo]



**1. REACTIVOS**

Aceite de Soja.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Acetato de $\alpha$ -Tocoferol.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Acetato de Retinol.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Acetonitrilo.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Ácido acético glacial.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Ácido clorhídrico 37%.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Ácido dietilentriaminotetraacético (DPTA).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Ácido etilendinitrilotetraacético, sal disódica (EDTA).....	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Ácido etilenglicol-bis-( $\beta$ -aminoetileter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Ácido fórmico.....	(Fluka Biochemika, St. Gallen, Suiza)
Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanosulfónico (HEPES).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS).....	(Amresco, Ohio, EE.UU.)
Ácido sulfúrico.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Ácido tricloroacético (TCA).....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Acrilamida.....	(Serva, Heidelberg, Alemania)
Adenosín 5'-trifosfato (ATP).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
$\gamma$ -[ $^{33}\text{P}$ ]-Adenosín 5'-trifosfato ([ $^{33}\text{P}$ ]-ATP).....	(Perkin Elmer, Boston, Ma. EE.UU.)
Adenosín 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
[ $^3\text{H}$ ]-Adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico ([ $^3\text{H}$ ]-AMPc)....	(Perkin Elmer, Boston, Ma. EE.UU.)
ADNasa I.....	(Roche, Mannheim, Alemania)
Agua oxigenada 33% ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Albúmina sérica bovina (BSA).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Alcohol isoamílico.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Antibióticos y antimicóticos para cultivos.....	(Invitrogen, Barcelona, España)
Anticuerpos policlonales anti-ACI, anti-ACV/VI, anti ACVIII.....	(Santa Cruz Biotech, California, EE.UU.)
Anticuerpo monoclonal anti-CREB.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Anticuerpo monoclonal anti-p-CREB.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)



- Anticuerpo monoclonal anti-ERK1/2.....(Santa Cruz Biotech, California, EE.UU.)
- Anticuerpo monoclonal anti p-ERK1/2.....(Santa Cruz Biotech, California, EE.UU.)
- Anticuerpos anti-Gi $\alpha$ 1, anti-Gi $\alpha$ 2 y anti-Gi $\alpha$ 3.....(Santa Cruz Biotech, California, EE.UU.)
- Anticuerpos monoclonales anti-GRK2, anti-GRK5 y anti-GRK6.....(Santa Cruz Biotech, California, EE.UU.)
- Anticuerpo monoclonal anti-JNK/SAPK.....(Cell Signalling, Beverly, Ma, EE.UU.)
- Anticuerpo monoclonal anti-p-JNK/p-SAPK.....(Cell Signalling, Beverly, Ma, EE.UU.)
- Anticuerpo monoclonal anti-p-PKB/p-Akt.....(Cell Signalling, Beverly, Ma, EE.UU.)
- Anticuerpo policlonal anti-PKC $\delta$ .....(Santa Cruz Biotech, California, EE.UU.)
- Anticuerpo policlonal anti-Pro-hormona convertasa 2 (PC2).....(Santa Cruz Biotech, California, EE.UU.)
- Anticuerpo policlonal anti-PTP $\eta$ .....(Santa Cruz Biotech, California, EE.UU.)
- Anticuerpo policlonal anti-SHP-1.....(Santa Cruz Biotech, California, EE.UU.)
- Anticuerpos policlonales anti-SSTR1-4.....(Santa Cruz Biotech, California, EE.UU.)
- Anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -tubulina.....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Anticuerpos 2<sup>arios</sup> (conjugados con peroxidasa).....(Santa Cruz Biotech, California, EE.UU.)
- Azida sódica.....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Azul de bromofenol.....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Bacitracina.....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Bromuro de etidio.....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Cacodilato sódico.....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Carbón Activo.....(Panreac Química, Barcelona, España)
- Cloramina T .....(Merck, Darmstadt, Alemania)
- Cloruro magnésico hexahidrato.....(Panreac Química, Barcelona, España)
- Cloruro de Manganeso (II).....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Cloruro sódico.....(Fluka Biochemika, St. Gallen, Suiza)
- Creatina fosfato (CP).....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Creatina quinasa (CK).....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Cubreobjetos *Poly-prep*.....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-Desoxicitosín 5' -trifosfato ([<sup>32</sup>P]-dCTP).....(Amersham, Buckinghamshire, R.U.)
- Dextrano.....(Amersham, Buckinghamshire, R.U.)
- Dietilpirocarbonato.....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)



Dihidrogenofosfato sódico.....	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Dimetilsulfóxido (DMSO).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
2,6-Di- <i>tert</i> -butil-4-metilfenol (BHT).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Ditiotreitol.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Duodecil sulfato sódico.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Esperma de salmón.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Etanol 96°.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Etanol absoluto.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Factor de crecimiento epidérmico (EGF).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Fenol.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Ficoll.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Forskolina (FK).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Formamida desionizada.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Fosfato potásico.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Formaldehído 37%.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Glicina.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Glicerol.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
5'-Guanililimidodifosfato -Gpp(NH)p-.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Guanosín 5'-trifosfato (GTP).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Hematoxilina de Harris.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Heparina.....	(Roche, Mannheim, Alemania)
n-Hexano.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Hidrogenofosfato disódico.....	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Hidróxido potásico.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Hidróxido sódico.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Igepal CA-630 (Nonidet P-40).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Inhibidor de tripsina de soja (STI).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Isobutanol.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Isopropanol.....	(Fluka Biochemika, St. Gallen, Suiza)
Kit de extracción de ARN (TriReagent).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)



- Kit de marcaje de ácidos nucleicos (Rediprime II).....(Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido)
- Kit de purificación de ARNm (GenElute).....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Kit de quimioluminiscencia.....(Santa Cruz Biotech, California, EE.UU.)
- Kit de SYBR green para PCR a tiempo real.....(Biotools, Madrid, España)
- Kit de tinción TUNEL.....(Promega Biotech. Ibérica, Madrid, España)
- Líquido de centelleo OptiPhase HiSafeII.....(Perkin Elmer, Boston, Ma. EE.UU.)
- Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM).....(Invitrogen, Barcelona, España)
- Medio de inclusión para cortes con criostato *Tissue-Tek*.....(Sakura Finetek Europa, Zoeterwoude, Holanda)
- Medio de montaje DePeX.....(Serva, Heidelberg, Alemania)
- Membranas de PVDF y Nylon.....(Amersham, Buckinghamshire, R.U.)
- $\beta$ -Mercaptoetanol.....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Metabisulfito sódico.....(Merck, Darmstadt, Alemania)
- Molibdato amónico tetrahidrato.....(Fluka Biochemika, St. Gallen, Suiza)
- $\text{Na}^{125}\text{I}$ .....(Perkin Elmer, Boston, Ma. EE.UU.)
- N', N'-metilen-bisacrilamida.....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED).....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Oligo(dT).....(Invitrogen, Barcelona, España)
- Ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ).....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Óxido de Aluminio activo (Alúmina).....(Merck, Darmstadt, Alemania)
- Persulfato sódico.....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Polietilenglicol 200 (PEG).....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Poliglutiltirosina.....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Polivinilpirrolidona.....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- 1-Propanol.....(Panreac Química, Barcelona, España)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu.....(Merck, Darmstadt, Alemania)
- Rojo Ponceau.....(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
- Sacarosa.....(Merck, Darmstadt, Alemania)
- Sephadex G-25 fino.....(Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido)
- Set de inhibidores de proteasas *Complete Mini EDTA-free*.....(Roche, Mannheim, Alemania)
- Somatostatina-14 (SST-14).....(Calbiochem, La Jolla, Ca, EE.UU.)



---

SQ 22536.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Suero fetal bovino (SFB).....	(Invitrogen, Barcelona, España)
Sulfato de cobre (II).....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Sulfato magnésico.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Talco.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Tartrato sódico potásico.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Teofilina.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Tetrametoxipropano.....	(Merck, Darmstadt, Alemania)
$\alpha$ -Tocoferol.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Todo- <i>trans</i> -retinol.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Tolueno.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney.....	(Invitrogen, Barcelona, España)
Trietanolamina (TEA).....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Tris-hidroximetil-amino-metano (Tris).....	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Tritón X-100.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Tween-20.....	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Tyr <sup>11</sup> -SST-14.....	(Bachem, Bubendorf, Suiza)
Xilen-cianol FF.....	(Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.)
Xileno.....	(Panreac Química, Barcelona, España)





## **2. ANIMALES Y MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN**

### **2.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

En el presente trabajo se han utilizado ratas Sprague-Dawley (SD) macho, recién destetadas o con una edad de 15 semanas, procedentes de Charles River Laboratories. Los animales se sometieron a ciclos constantes de 12 h de luz y de oscuridad, manteniéndose el estabulario a una temperatura de 22-24 °C, con ventilación continua. La alimentación que recibieron las ratas de los grupos control constaba de pienso granulado (dieta completa de mantenimiento para ratas UAR A04, Panlab) y, como bebida, agua corriente *ad libitum*.

### **2.2. MODELO DE DEFICIENCIA DE VITAMINA A**

El modelo de deficiencia de VA se induce siguiendo el método de Cocco y col. (2002) usando ratas SD macho recién destetadas. Las ratas de los grupos con deficiencia de VA recibieron un pienso carente en VA (Harlan, dieta carente en VA -8603-) durante un periodo de 12 semanas.

#### **2.2.1. Tratamiento con vitamina A**

El tratamiento de las ratas con VA se basó en el modelo propuesto por Husson y col. (2003). La VA en forma de todo-*trans*-retinol (TTR) se disolvió en una mezcla de polietilenglicol (PEG)/etanol/salino (70/10/20) y se inyectó a una dosis de 150 µg/kg peso, por vía intraperitoneal, durante una semana a ratas control y a ratas con deficiencia de VA. Las ratas control no tratadas con VA recibieron sólo el vehículo.

### **2.3. MODELO DE DEFICIENCIA DE VITAMINA E**

El modelo de deficiencia de VE se basó en el protocolo descrito por Fukui y col. (2001) usando ratas SD machos de 15 semanas. Las ratas de los grupos con deficiencia de VE recibieron un pienso carente en VE (Panlab, pienso A04 sin VE) durante un periodo de 9 semanas.

#### **2.3.1. Tratamiento con vitamina E**

El tratamiento de las ratas con VE se basó en el protocolo propuesto por Socci y col. (1995). La VE en forma de  $\alpha$ -tocoferol se disolvió en 300 µl de aceite de soja y se inyectó por vía intraperitoneal en dosis de 200 mg/kg de peso durante una semana a ratas control y ratas deficitarias en VE. Las ratas control no tratadas con  $\alpha$ -tocoferol recibieron sólo el vehículo.



### **3. EXTRACCIÓN DEL ENCÉFALO Y DISECCIÓN DEL HIPOCAMPO**

#### **3.1. EXTRACCIÓN DEL ENCÉFALO**

Los animales se sacrifican por decapitación con una guillotina a nivel de la primera y segunda vértebra cervical. Inmediatamente después del sacrificio, se procede a la extracción del encéfalo. Se efectúa una incisión longitudinal de la piel de la cabeza, de nuca a hocico, y una vez retirada la piel, se disecan los músculos dorsales de la nuca.

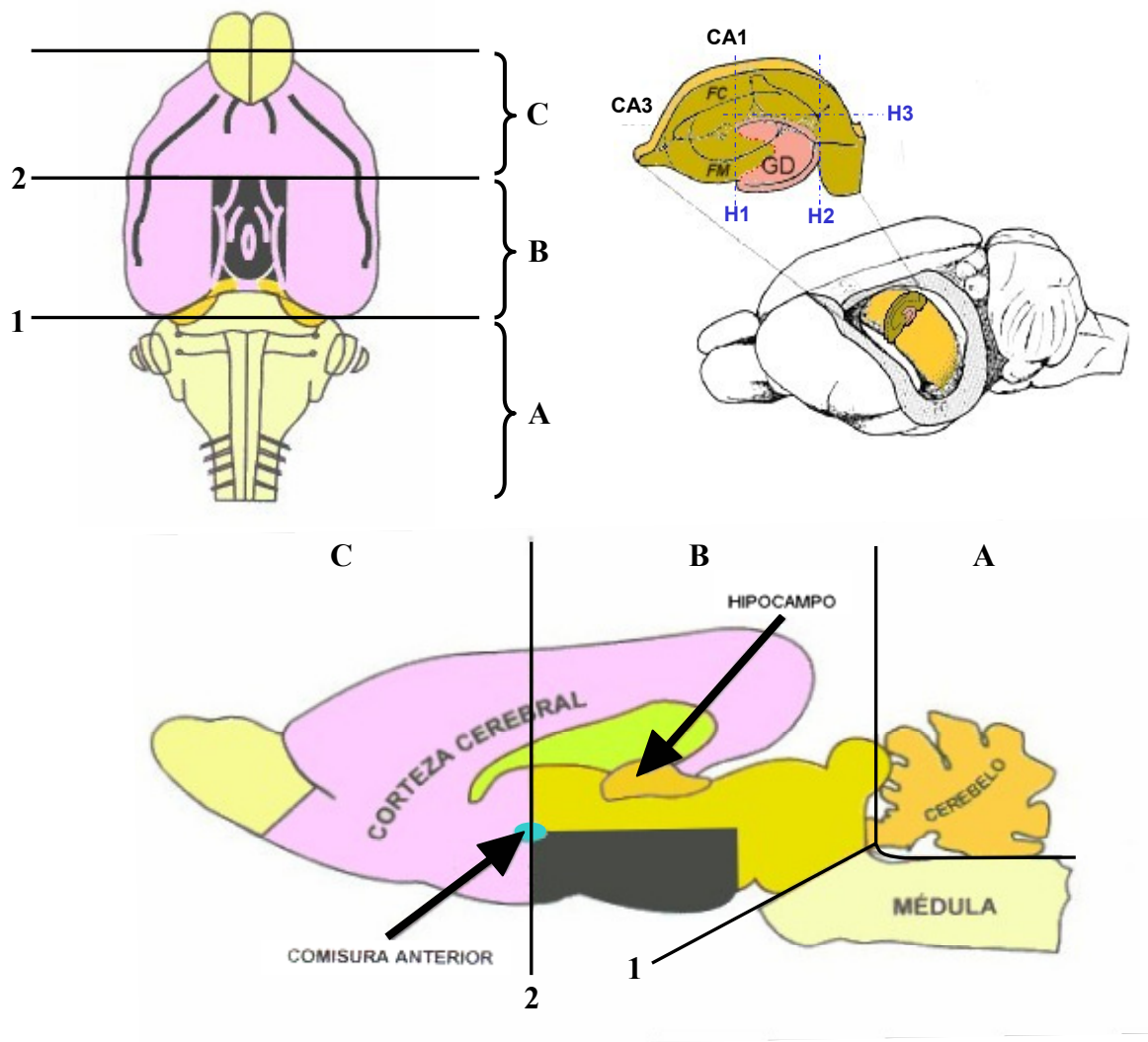
Se introduce la punta de unas tijeras finas en los márgenes laterales del agujero occipital, de forma laterodorsal al bulbo raquídeo, y en dirección oblicua hacia el conducto auditivo externo. Con unas pinzas, se separa el hueso occipital haciendo presión hacia fuera y, del mismo modo, se levantan los huesos parietales haciendo tracción hacia arriba. Normalmente, al separar los huesos parietales se desprende la duramadre, dejando accesible el cerebro; de no ser así, se corta longitudinalmente en dirección al espacio interhemisférico y se separa posteriormente hacia los lados con unas pinzas finas. A veces, es necesario ampliar la craneotomía mediante sección y eliminación de fragmentos de los huesos frontales para obtener el encéfalo en su totalidad.

Una vez aislada la porción dorsal del cerebro, se seccionan los nervios olfatorios con una espátula roma, que se pasa por debajo y por delante de la sutura frontoparietal. Posteriormente, se seccionan los fascículos ópticos, las arterias carótidas, el tallo hipofisario y los nervios craneales que salen a uno y otro lado del tronco cerebral, quedando libre el encéfalo, el cual se extrae y se deposita sobre una placa de metal enfriada en hielo.

#### **3.2. DISECCIÓN DEL CEREBRO**

Una vez extraído el cerebro se procede a la disección del hipocampo por el método de Glowinski e Iversen (1966).

El cerebro se deja reposar sobre su parte convexa y se separa el rombencéfalo (A) del resto del cerebro mediante una sección transversal (*Figura 29, sección 1*), descartándolo. A continuación, se realiza una sección transversal a nivel del quiasma óptico que pasa a través de la comisura anterior (*Figura 29, sección 2*), el cual delimita la parte anterior del hipotálamo. Esta sección separa el cerebro en dos partes: B y C.



**Figura 29:** Representación esquemática de la disección del cerebro y situación del hipocampo con algunas de sus áreas. CA: Cuerno de Amón; GD: giro dentado; FM: fibras musgosas; FC: Fibras colaterales de Schaffer.

El hipocampo se obtiene de la parte B, eliminando el cerebro medio y dejando así dicha estructura al descubierto. Una vez extraído el hipocampo, el GD puede aislarse, con ayuda de un estereomicroscopio, haciendo tres cortes longitudinales (H1, H2 y H3) (Figura 29) con el bisturí para separarlo del resto de la formación hipocampal.



## **4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

### **4.1. OBTENCIÓN DE MEMBRANAS CELULARES Y CITOSOLES**

#### **4.1.1 Reactivos**

- Tampón HEPES 10 mM, pH 7,6
- Tampón de homogeneizado:
  - ✓ HEPES 10 mM, pH 7,6
  - ✓ EDTA 5 mM
  - ✓ EGTA 1 mM
  - ✓ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM
  - ✓ Una pastilla de *Complete Mini EDTA-free* de Roche por cada 15 ml de tampón
- Tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5

#### **4.1.2. Método**

El proceso de aislamiento de las membranas cerebrales se lleva a cabo según el método descrito por Reubi y col. (1981) y modificado por Pardo-Fernández y col. (2002). Una vez aislado, se suspende el hipocampo en 2 ml de tampón de homogeneizado frío y se homogeneiza 15 segundos en un *Polytron* a velocidad moderada (5). A continuación, se centrifugan las muestras a 600 x g durante 10 minutos a 4°C y se recoge el sobrenadante (sobrenadante "A"), descartando el precipitado. Este sobrenadante "A" se centrifuga a 48000 x g durante 30 minutos a 4°C, recogiendo el nuevo sobrenadante (sobrenadante "B") en tubos de ultracentrífuga. El precipitado (precipitado "A") se resuspende en 10 ml de HEPES 10 mM, se centrifuga nuevamente a 48000 x g durante 30 minutos a 4°C y se descarta el sobrenadante. El precipitado "A" se resuspende en 500 µl de Tris-HCl 50 mM y se alicuota. Estas alícuotas se conservan a -80°C, guardando una pequeña muestra para medir la concentración de proteínas por el método de Lowry y col. (1951).

Para separar el citosol, se ultracentrifuga el sobrenadante "B" a 150000 x g durante 1 hora a 4°C. Se recoge el sobrenadante y se conserva a -80°C, separando una pequeña muestra para medir la concentración de proteínas por el método de Lowry y col. (1951)



## **4.2. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE**

### **4.2.1. Reactivos**

- Tampón de lisis:
  - ✓ HEPES 20 mM, pH 7,5
  - ✓ EDTA 1 mM
  - ✓ NaCl 150 mM
  - ✓ Triton X-100 1%
  - ✓ Glicerol 5%
  - ✓ STI 5 µg/ml
  - ✓ PMSF 1 mM
  - ✓ Aprotinina 5 µg/ml
  - ✓ Leupeptina 5 µg/ml
  - ✓ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM
  - ✓ Pirofosfato sódico (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)

### **4.2.2. Método**

El extracto celular soluble se utiliza para determinar los niveles de CREB, p-CREB, ERK1/2, p-ERK1/2, PC2, PKCδ, p-Akt/p-PKB, JNK/SAPK y p-JNK/p-SAPK basándose en el protocolo de Hawes y col. (2005). Asimismo, se utiliza dicho extracto para determinar el grado de peroxidación lipídica conforme al método de Ottolenghi (1959) y los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG).

Una vez aislado el hipocampo, se extrae una pequeña muestra del mismo y se suspende en 500 µl de tampón de lisis. A continuación, se sonica la muestra durante 15 segundos y se incuba 30 minutos a 4°C en agitación. Pasado este tiempo, se centrifuga la muestra 15 minutos a 16000 x g y se alicuota el sobrenadante. Por último, se determina la concentración de proteínas por el método de Lowry y col. (1951).

## **4.3. OBTENCIÓN DE PLASMA**

Bajo anestesia con isoflurano, se extrae sangre de las ratas mediante punción cardíaca y se transfiere a tubos con heparina para evitar su coagulación. Los tubos se mantienen a 4°C y en oscuridad para evitar la fotoisomerización de los retinoides.

A continuación, se centrifuga la sangre a 3200 x g durante 20 minutos para separar la fracción celular del plasma y se alicuota este en tubos eppendorf de color ámbar. Se



almacenan a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización. Se separa una pequeña muestra de plasma para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry y col. (1951).

## **5. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE RETINOL Y TOCOFEROL EN PLASMA, HÍGADO E HIPOCAMPO**

Los niveles de TTR y  $\alpha$ -tocoferol se miden mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa utilizando una columna C-18 (Vydac 201TP54) según una modificación del protocolo de Ortega y col. (2004). Todo el proceso de extracción se realiza bajo luz roja para evitar la fotoisomerización del retinol.

### **5.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

#### **5.1.1. Reactivos**

- Etanol
- Metanol
- Cloroformo
- Acetonitrilo
- 1-Propanol
- 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT)
- Hidróxido potásico (KOH)
- n-Hexano
- Todo-*trans*-retinol (TTR)
- $\alpha$ -Tocoferol
- Mezcla de patrones internos (disueltos en etanol / 1 mM de BHT):
  - ✓ 10  $\mu\text{g/ml}$  de acetato de retinol
  - ✓ 20  $\mu\text{g/ml}$  de acetato de tocoferol

#### **5.1.2. Método.**

##### **5.1.2.1. Extracción de todo-*trans*-retinol y $\alpha$ -tocoferol de hígado e hipocampo**

Una vez sacrificada la rata, se obtienen muestras de hipocampo y de hígado y se depositan en tubos opacos que contienen 1 ml de Etanol / KOH 1 M y 200  $\mu\text{l}$  de BHT 1 mM. El tejido se sonica hasta su completa homogenización y a continuación se incuba durante 1 hora a  $90^{\circ}\text{C}$  para que se produzca la saponificación de los ésteres de retinol y tocoferol. Después, se añaden a cada tubo 50  $\mu\text{l}$  de la mezcla de patrones internos, 1 ml de n-hexano y



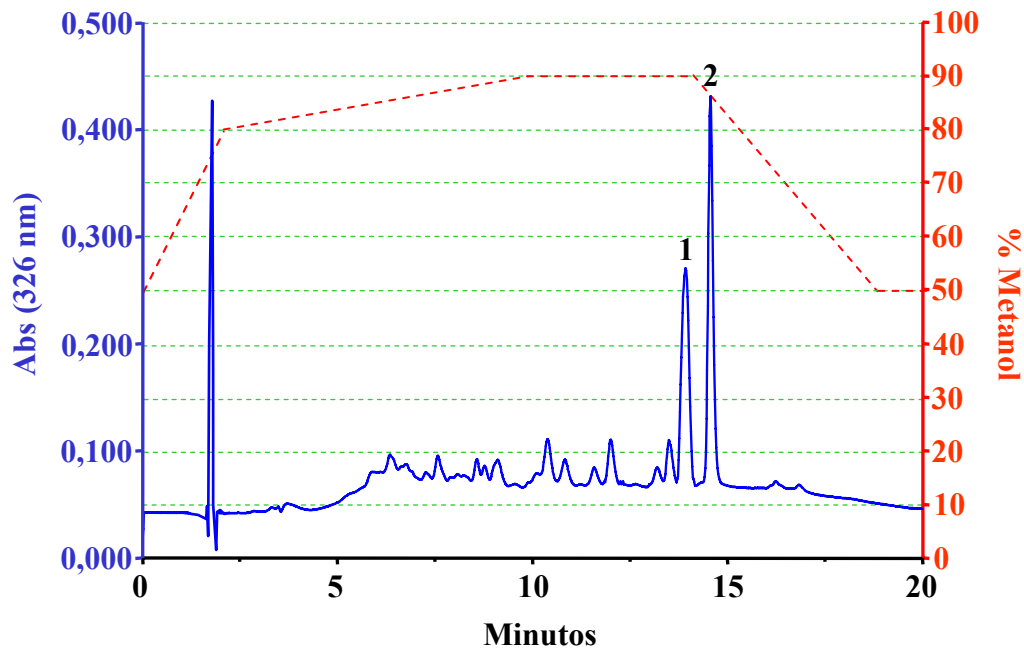
200  $\mu$ l de agua destilada y se agita durante 3 minutos con un vórtex. Se centrifugan las muestras a 800 x g durante 10 minutos y se transfiere la fase superior a tubos de HPLC. Esta extracción se repite otra vez y, finalmente, se secan los tubos con un chorro de nitrógeno hasta la completa evaporación del hexano. El producto se resuspende en 200  $\mu$ l de 1-propanol:acetonitrilo (1:1) y se inyectan 50  $\mu$ l en el cromatógrafo.

#### **5.1.2.2. Extracción de todo-*trans*-retinol y $\alpha$ -tocoferol en plasma**

A cada 200  $\mu$ l de plasma se le añaden 50  $\mu$ l de la mezcla de estándares internos, 150  $\mu$ l de etanol y 200  $\mu$ l de metanol para que precipiten las proteínas. Se agita en un vórtex durante 1 minuto y se deja reposar durante 30 minutos en hielo. A continuación, se repite el procedimiento de extracción en hexano descrito en el apartado anterior. El producto se resuspende en 200  $\mu$ l de 1-propanol:acetonitrilo (1:1) y se inyectan 50  $\mu$ l en el cromatógrafo.

### **5.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TODO-*TRANS*-RETINOL**

Se prepara una recta de calibrado con concentraciones de TTR desde 1,5  $\mu$ g/ml a 5 ng/ml disueltos en 1-propanol:acetonitrilo (1:1) para establecer la recta de calibrado. Se utiliza como fase móvil un gradiente de metanol:agua variable en el tiempo a un flujo de 1 ml/min. Se inicia cada ensayo con una concentración de metanol del 50%. Durante los dos primeros minutos se aumenta linealmente el contenido en metanol hasta el 80% para, a continuación, seguir aumentándolo hasta el 90% durante 8 minutos. Estas condiciones se mantienen 4 minutos y, finalmente, se regresa a las condiciones iniciales de manera progresiva durante 5 minutos, manteniéndose durante un minuto más a un flujo de 3 ml/min para reequilibrar la columna antes de inyectar la siguiente muestra. Durante todo el proceso se registra la absorbancia a 326 nm (Figura 30). El pico de TTR se identifica gracias al tiempo de retención, que se compara con los patrones utilizados para la recta de calibrado. A continuación, se calcula su área con el programa Borwin v.1,5 (JMBS Developments, Le Fontanil, Francia) y se corrige con el área del acetato de retinol para evitar posibles variaciones que puedan haber ocurrido durante la extracción orgánica a partir de las muestras.

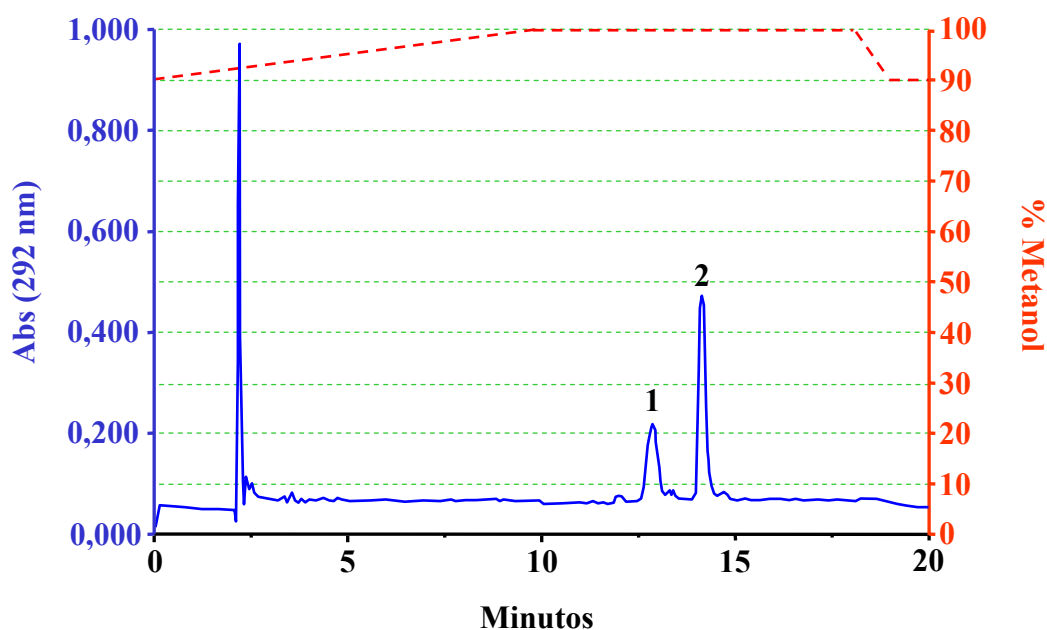


**Figura 30:** Cromatograma representativo de un ensayo de HPLC de Vitamina A. 1-*Todo-trans*-retinol. 2- Acetato de retinol.

### 5.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE $\alpha$ -TOCOFEROL

Se prepara una recta de calibrado con concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol desde 4,5  $\mu\text{g/ml}$  a 5 ng/ml disueltos en 1-propanol:acetonitrilo (1:1). Se utiliza como fase móvil un gradiente de metanol:agua variable en el tiempo a un flujo de 1 ml/min. Cada ensayo comienza con una concentración de metanol de 90%. Durante los primeros 10 minutos la concentración de metanol aumenta hasta el 100% de manera lineal, manteniéndose así 8 minutos más. Finalmente, se vuelve de manera lineal a las condiciones iniciales durante un minuto y, por último, se aumenta el flujo a 3 ml/min un minuto más para reequilibrar la columna antes de la inyección de la siguiente muestra. Durante todo el proceso se registra la absorbancia a 292 nm (Figura 31). El pico del  $\alpha$ -Tocoferol se identifica mediante el tiempo de retención, que se compara con los patrones utilizados para la recta de calibrado. A continuación, se calcula su área con el programa Borwin v.1,5 (JMBS Developments, Le Fontanil, Francia) y se corrige con el área del acetato de retinol para evitar posibles variaciones que puedan haber ocurrido durante la extracción orgánica a partir de las muestras.





**Figura 31:** Cromatograma representativo de un ensayo de HPLC de Vitamina E. 1-  $\alpha$ -Tocoferol. 2- Acetato de tocoferol.

## 6. MARCAJE DE TYR<sup>11</sup>-SOMATOSTATINA-14 CON Na<sup>125</sup>I

El marcaje de la Tyr<sup>11</sup>-SST-14 se realiza según el método descrito por Greenwood y col. (1963). Después de la reacción del marcaje, se purifica la mezcla de reacción por cromatografía de exclusión molecular para separar el trazador del <sup>125</sup>I no unido y del resto de las impurezas que le acompañan. Dicha purificación se realiza en una columna de Sephadex G-25 fino equilibrada con ácido acético 0,1 M/BSA 0,1%.

### 6.1. REACTIVOS

- Tyr<sup>11</sup>-Somatostatina:
  - ✓ Se disuelven 0,5 mg de Tyr<sup>11</sup>-SST-14 en 0,5 ml de ácido acético 0,1 M. A 100  $\mu$ l de la solución del péptido, se le añaden 300  $\mu$ l de un tampón acetato sódico 0,1 M a pH 7,4. Se utilizarán 10  $\mu$ l de dicha solución para el marcaje.
- Cloramina T (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>ClNO<sub>2</sub>SNa.H<sub>2</sub>O):
  - ✓ Se disuelven 10 mg de Cloramina T en 5 ml de tampón fosfato potásico 0,3 M, pH 7,5. Se prepara dicha solución 10 minutos antes del marcaje y se deja en oscuridad hasta su uso.



- Metabisulfito sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ):
  - ✓ Se disuelven 20 mg de Metabisulfito sódico en 5 ml de tampón fosfato potásico 0,3 M, pH 7,5.
- Tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4 que contiene 0,25% de BSA:
  - ✓ Se disuelven 1,15 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0,296 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en 100 ml de agua bidestilada y se ajusta el pH. Después, se separan 50 ml y se añaden 0,125g de BSA.
- Tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4 que contiene 5% talco:
  - ✓ Se toman los 50 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M que sobraron de preparar el tampón anterior y se le añaden 2,5 g de talco. Se mantiene en agitación continua.
- Tampón de elución:
  - ✓ Ácido acético 0,1 M con 0,1% de BSA.

## 6.2. PREPARACIÓN DE LA COLUMNA

Se añaden de 9 a 10 g de Sephadex G-25 (fino) a 50 ml de agua destilada y desionizada, hirviendo la mezcla al baño maría durante 1 hora. Después, se deja reposar la mezcla para eliminar, posteriormente, el agua. A este Sephadex, se le añaden 50 ml de tampón de elución y se deposita en una columna de vidrio de 1x45 cm hasta conseguir una altura aproximada de 40 cm. Una vez empaquetada la columna, se equilibra con 50 ml de tampón de elución fresco.

## 6.3. MARCAJE

La reacción de marcaje tiene lugar a temperatura ambiente, en un tubo de tipo eppendorf que contiene 10  $\mu\text{l}$  de Tyr<sup>11</sup>-SST-14 (2,5  $\mu\text{g}$ ). A este tubo se le añaden 40  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato potásico 0,3 M, pH 7,5 y, a continuación, se retiran 10  $\mu\text{l}$  para que la cantidad de Tyr<sup>11</sup>-SST-14 que quede para el marcaje sea de 2  $\mu\text{g}$ . Posteriormente se añade 1 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  y 5  $\mu\text{l}$  de la disolución de Cloramina T y se agita la mezcla durante 30 segundos. Finalmente, se agregan 5  $\mu\text{l}$  de la disolución de metabisulfito sódico y 200  $\mu\text{l}$  de tampón de elución para detener la reacción. Se toma una alícuota de 1  $\mu\text{l}$  de la mezcla de marcaje y se pasa a un tubo que contiene 1 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4 con BSA 0,25% para determinar el porcentaje de incorporación de  $^{125}\text{I}$  al péptido mediante el test de adsorción al talco.



### 6.4. PURIFICACIÓN

Se deja que el volumen de líquido que se encuentra por encima del Sephadex G-25 penetre en el lecho cromatográfico y se añade la mezcla de reacción, esperando a que penetre en el gel. Se va añadiendo tampón de elución a razón de 30 ml/hora, recogiendo alícuotas de 1 ml en el colector de fracciones. Se toman alícuotas de 10 µl de cada tubo para contar la radiactividad y realizar el perfil de marcaje (Figura 32). Finalmente, se mezclan los tubos correspondientes al péptido marcado y se reparte el volumen resultante en alícuotas de 0,2 ml, que se conservan a -20°C.

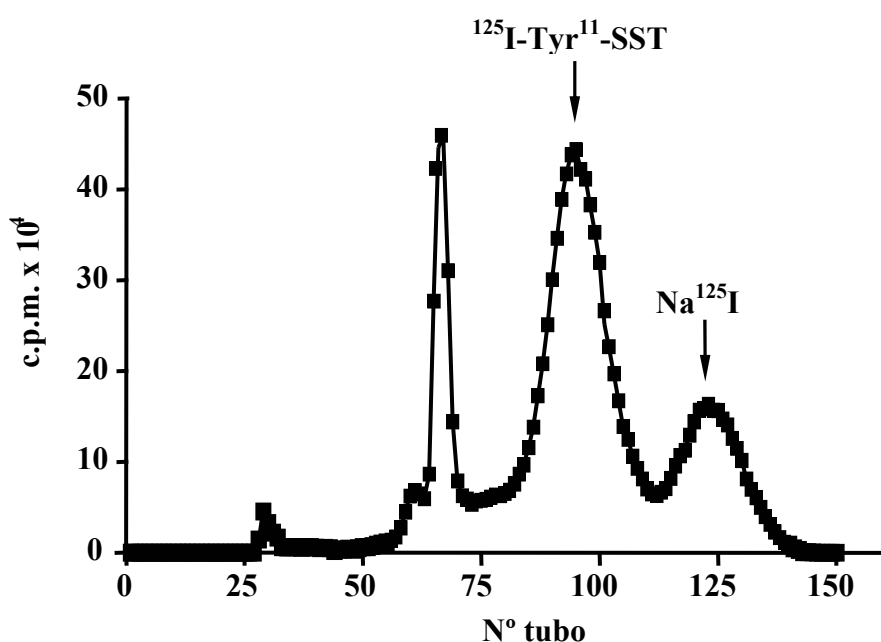


Figura 32: Purificación de la Tyr<sup>11</sup>-SST marcada con <sup>125</sup>I en una columna de Sephadex G-25

### 6.5. TEST DE ADSORCIÓN A TALCO

A 1 µl de la mezcla de reacción, cuya radiactividad se ha medido previamente, se le añade 1 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4, que contiene BSA al 0,25% y 1 ml de suspensión de talco 5% en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4. Se centrifuga la mezcla 10 minutos a 750 x g, se aspira el sobrenadante y se mide la radiación emitida por los sedimentos que quedan tras la centrifugación. Conociendo la radiactividad total en cuentas por minuto (c.p.m. total) de la muestra anterior al test y la radiactividad del sedimento (c.p.m. sedimento), el porcentaje de incorporación (% I) se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% I = \frac{\text{cpm sedimento}}{\text{cpm total}} \times 100$$



## **7. DETERMINACIÓN DE LA SOMATOSTATINA TISULAR**

### **7.1. EXTRACCIÓN DE LA SOMATOSTATINA TISULAR**

La extracción de la SST tisular se realiza mediante el método modificado de Patel y Reichlin (1978). Una vez aislado el hipocampo, se deposita una pequeña muestra de tejido en tubos de vidrio que contienen 1 ml de ácido acético 2 N. Se homogeneizan las muestras durante 30 segundos en un *Polytron* a velocidad moderada (5) y se calientan a 100° C durante 5 minutos. Tras dejar las muestras 5 minutos en hielo, se vuelven a homogeneizar en el *Polytron* durante 30 segundos más. El homogeneizado se centrifuga a 15000 x g durante 5 minutos, a 4°C. Se recoge el sobrenadante y se alícuota, guardando las muestras a -20°C hasta el día del ensayo. Se utiliza una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry y col. (1951).

### **7.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SOMATOSTATINA TISULAR**

#### **7.2.1. Reactivos**

- Tampón de RIA:
  - ✓ Tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,2
  - ✓ Azida sódica 0,1%
  - ✓ BSA 0,2%
- <sup>125</sup>I-Tyr<sup>11</sup>-SST diluida en tampón de RIA (aprox. 600 c.p.m./μl)
- SST “fría” para la curva

#### **7.2.2. Método**

La concentración de SST en el extracto tisular de hipocampo se determina por radioinmunoanálisis (RIA) siguiendo un método modificado de Patel y Reichlin (1978). Dicha determinación se realiza en tubos de vidrio que contienen:

- 100 μl de extracto tisular ó 100 μl de SST a una cantidad de 0 a 1000 fmol/tubo (curva de calibrado), diluido en tampón de RIA
- 400 μl de tampón RIA
- 100 μl de <sup>125</sup>I-Tyr<sup>11</sup>-SST diluida en tampón de RIA (aproximadamente 6000 c.p.m./tubo)
- 200 μl de anticuerpo anti-SST diluido en tampón de RIA



Además, se preparan cuatro tubos de actividad total que sólo contienen 100 µl de  $^{125}\text{I}$ -Tyr<sup>11</sup>-SST, dos tubos para calcular la unión inespecífica que llevan 700 µl de tampón RIA y 100 µl del péptido marcado, y dos tubos para calcular el inespecífico de las muestras, que contienen 600 µl de tampón RIA, 100 µl del extracto tisular de SST y 100 µl del péptido marcado. Todos los tubos se incuban a 4°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se añade a todos los tubos, excepto a los de actividad total, 1 ml de carbón activo (2%)/dextranso (0,2%). Se dejan reposar los tubos en hielo durante 15 minutos y después se centrifugan a 2000 x g durante 10 minutos para separar la fracción de SST unida de la fracción no unida al anticuerpo. Finalmente, se aspira el sobrenadante y se mide la radiactividad en el sedimento en un contador de radiactividad  $\gamma$  (Wallac Pharmacia 1282 Compugamma CS).

## 8. UNIÓN DE LA SOMATOSTATINA A SUS RECEPTORES ESPECÍFICOS EN MEMBRANAS DE HIPOCAMPO

La unión específica de la SST se determina mediante un método modificado de Czernik y Petrack (1983).

### 8.1. REACTIVOS

- Ácido acético 0,1 M que contiene BSA 0,1%
- Tampón de incubación:
  - ✓ Tris-HCl 50 mM, pH 7,5
  - ✓ MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5 mM
  - ✓ BSA 0,2%
  - ✓ Bacitracina 0,1 mg/ml
- Tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,4 / Sacarosa 9%
- Somatostatina fría:
  - ✓ A partir de una alícuota de SST-14 ( $6,1 \times 10^{-4}$  M) disuelta en ácido acético 0,1 M que contiene BSA 0,1%, se prepara una curva de SST en tampón de incubación a concentraciones finales de  $10^{-11}$  hasta  $10^{-6}$  M. Esta última concentración se utiliza para estudiar la unión inespecífica.
- $^{125}\text{I}$ -Tyr<sup>11</sup>-SST:
  - ✓ Una alícuota de  $^{125}\text{I}$ -Tyr<sup>11</sup>-SST se diluye en tampón de incubación hasta una concentración final de 250 pM.



- Membranas hipocampales:
  - ✓ Las membranas obtenidas según el método descrito anteriormente (apartado 4) se resuspenden en tampón de incubación a una concentración final de proteínas de 0,15 mg/ml.

## 8.2. MÉTODO

Se realizan incubaciones en tubos de tipo Beckman en un volumen final de 250  $\mu$ l. Los reactivos se añaden en el siguiente orden y volumen:

- 175  $\mu$ l de tampón de incubación.
- 25  $\mu$ l de SST fría ( $10^{-11}$ - $10^{-7}$  M). Los tubos con concentración “cero” llevan 25  $\mu$ l de tampón de incubación.
- 25  $\mu$ l de  $^{125}\text{I}$ -Tyr<sup>11</sup>-SST (250 pM) en tampón de incubación.

La reacción se inicia añadiendo 25  $\mu$ l de la correspondiente preparación de membranas. Los tubos se incuban 60 minutos en un baño a 30°C sin agitación. Al cabo de este periodo, las muestras se centrifugan en una microfuga a 11000 x g durante 2 minutos. A continuación se aspira el sobrenadante y se lava el precipitado con Tris/sacarosa, determinándose las c.p.m. en un contador  $\gamma$  (Wallac Pharmacia 1282 Compugamma CS) con una eficacia de contaje para el  $^{125}\text{I}$  del 86%.

Para calcular la radiactividad que se une de manera inespecífica ( $B_{\text{inespecífica}}$ ) y poder restarla de la unión total ( $B_{\text{total}}$ ) de cada muestra, se preparan dos tubos que contienen una cantidad de SST-14 fría elevada ( $10^{-6}$  M). Por otro lado, se preparan tubos que contienen únicamente 25  $\mu$ l de  $^{125}\text{I}$ -Tyr<sup>11</sup>-SST (Actividad total). Los resultados se expresan como porcentaje de  $^{125}\text{I}$ -Tyr<sup>11</sup>-SST unido específicamente (%B) respecto a la actividad total:

$$\%B = \frac{(B_{\text{total}} - B_{\text{inespecífica}}) \times 100}{\text{Actividad total}}$$

Finalmente, los datos se representan y analizan conforme al método de Scatchard (1949).



## **9. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS**

### **9.1. REACTIVOS**

- TTBS pH 7,5:
  - ✓ Tris-HCl 50 mM
  - ✓ NaCl 150 mM
  - ✓ Tween-20 0,05%
- Acrilamida/bisacrilamida 30% (29,2/0,8)
- Tampón de muestras pH 6,8:
  - ✓ Tris-HCl 60 mM, pH 6,8
  - ✓ SDS 3%
  - ✓ Glicerol 10%
  - ✓  $\beta$ -mercaptoetanol 1%
  - ✓ Azul de bromofenol 0,003%
- Tampón de electroforesis pH 8,5:
  - ✓ Tris-HCl 50 mM
  - ✓ Glicina 384 mM
  - ✓ SDS 0,1%
- Tampón de transferencia pH 8,3:
  - ✓ Tris-HCl 25 mM
  - ✓ Glicina 192 mM
  - ✓ Metanol 20%
  - ✓ SDS 0,05%
- Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8
- Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8

### **9.2. MÉTODO**

#### **9.2.1. Preparación de los geles**

- Gel separador (12% u 8%):
  - ✓ Tris-HCl 1,5 mM, pH 8,8
  - ✓ SDS 10%
  - ✓ Acrilamida/bisacrilamida 30%
  - ✓ Persulfato amónico 0,1 g/ml
  - ✓ Temed



- ✓ Agua
- Gel concentrador (5%):
  - ✓ Tris-HCl 0,5 mM, pH 6,8
  - ✓ SDS 10%
  - ✓ Acrilamida/bisacrilamida 30%
  - ✓ Persulfato amónico 0,1 g/ml
  - ✓ Temed
  - ✓ Agua

### **9.2.2. Preparación de las muestras**

Se toma un volumen de las muestras correspondiente a 100 µg de proteína y se centrifuga durante 5 minutos a 11000 x g en una minifuga. A continuación, se aspira el sobrenadante y el sedimento se resuspende en tampón de muestras a una concentración final de 5 µg/µl. En el caso de muestras de citosol o de la fracción soluble celular, estas se diluyen directamente en el tampón de muestras hasta dejarlas a la concentración deseada. Una vez diluidas y antes de cargarlas en el gel, se calientan a 100°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y se cargan 100 µg de proteínas en cada pocillo del gel.

### **9.2.3. Electroforesis y transferencia**

La electroforesis se realiza a 100 V a temperatura ambiente en tampón de electroforesis. Posteriormente, las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF activada con metanol mediante la aplicación de un campo eléctrico de 400 mA durante 90 minutos a 4°C en tampón de transferencia.

## **9.3. INMUNODETECCIÓN**

Las membranas de PVDF se bloquean con TTBS/leche al 5% durante 90 minutos a 4°C para bloquear los sitios de unión inespecíficos. Una vez bloqueada la membrana, se hace un lavado rápido con TTBS y se incuba durante toda la noche con el anticuerpo primario específico de la proteína objeto de estudio convenientemente diluido en TTBS (Tabla 13). Al día siguiente, se retira el anticuerpo primario y las membranas se lavan tres veces 5 minutos con TTBS/leche al 5%. Posteriormente, las membranas se incuban a 4°C durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano correspondiente diluido 1/4000. Finalmente, se retira el anticuerpo secundario y se realizan un mínimo de seis lavados de 5 minutos cada uno con TTBS para eliminar completamente los restos de





anticuerpo no unido. El revelado de los inmunoblots se lleva a cabo por quimioluminiscencia, utilizando un sistema de detección de Santa Cruz Biotechnologies y placas fotográficas *Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL* de Amersham Biosciences. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas en las placas fotográficas se realizó con el programa Scion Image (Scion Corp., Maryland, EE.UU.)

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Secundario</b>
ACI, ACV/VI policlonal	1/1000	Anti-conejo
AC VIII policlonal	1/1000	Anti-cabra
p-Akt/PKB monoclonal	1/1000	Anti-conejo
CREB total monoclonal	1/2000	Anti-conejo
p-CREB monoclonal	1/5000	Anti-conejo
ERK total monoclonal	1/5000	Anti-ratón
p-ERK1/2 monoclonal	1/2000	Anti-ratón
G $\alpha$ 1-2 monoclonal	1/1000	Anti-ratón
G $\alpha$ 3 policlonal	1/1000	Anti-conejo
GRK2 monoclonal	1/2000	Anti-ratón
GRK5-6 policlonal	1/1000	Anti-conejo
JNK/SAPK total monoclonal	1/5000	Anti-ratón
p-JNK/p-SAPK monoclonal	1/1000	Anti conejo
PC2 policlonal	1/1000	Anti-conejo
PKC $\delta$ monoclonal	1/1000	Anti-ratón
PTP $\eta$ policlonal	1/1000	Anti-cabra
SHP-1 monoclonal	1/1000	Anti-ratón
SSTR1-4 policlonal	1/1000	Anti-cabra
$\beta$ -tubulina monoclonal	1/5000	Anti-ratón

**Tabla 13: Relación de anticuerpos utilizados.**

## **10. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA**

El estudio de la actividad adenilato ciclasa (AC) se ha llevado a cabo de acuerdo con el método de Houslay y col. (1976), con pequeñas modificaciones. Este método se basa en cuantificar el AMPc producido mediante proteína enlazante, estableciendo una competición entre el AMPc producido, cuya concentración se desea averiguar, y <sup>3</sup>H-AMPc que se añade al medio a una concentración determinada, compitiendo ambos por unirse a las subunidades reguladoras de la proteína quinasa A (PKA).

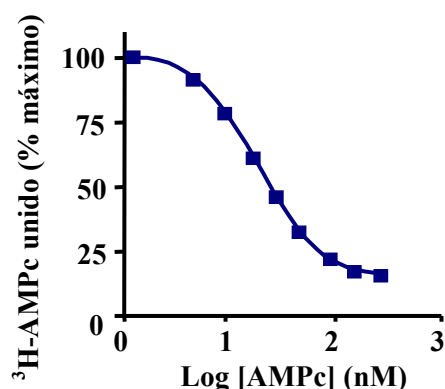


### 10.1. REACTIVOS

- Trietanolamina (TEA) 25 mM pH 7,4
- TEA 25 mM, pH 7,4/BSA 0,1%
- Tampón 1:
  - ✓ EDTA 6 mM y MgSO<sub>4</sub> 30 mM en TEA 25 mM, pH 7,4.
- Tampón 2:
  - ✓ IBMX 6 mM, bacitracina 6 mg/ml y PMSF 0,6 mM en TEA 25 mM, pH 7,4.
- Creatina fosfato (CP) 90 mg/ml en TEA 25 mM, pH 7,4
- Creatina quinasa (CK) 12 mg/ml en TEA 25 mM, pH 7,4
- Guanosín 5'-trifosfato (GTP) 10 μM en TEA 25 mM, pH 7,4
- Adenosín 5'-trifosfato (ATP) 15 mM en TEA 25 mM pH 7,4
- Cóctel:
  - ✓ 1 volumen de tampón 1
  - ✓ 1 volumen de tampón 2
  - ✓ 0,5 volúmenes de CP
  - ✓ 0,5 volúmenes de CK
  - ✓ 0,006 volúmenes de GTP
- Medio de la curva:
  - ✓ 1 volumen de tampón 1
  - ✓ 1 volumen de tampón 2
  - ✓ 1,6 volúmenes de TEA 25 mM, pH 7,4
  - ✓ 0,4 volúmenes de ATP
- Medio de dilución:
  - ✓ 1 volumen de tampón 1
  - ✓ 1 volumen de tampón 2
  - ✓ 2 volúmenes de TEA 25 mM, pH 7,4
- Alúmina:
  - ✓ 0,75 mg/ml de alúmina en TEA 25 mM, pH 7,4. Se mantiene en agitación continua.
- Solución PK:
  - ✓ 100 ml de tampón fosfato 0,2 M, pH 6,5
  - ✓ 2 g de BSA
  - ✓ 0,186 de EDTA



- ✓ 0,0144 g de teofilina
- ✓ 41 µl de β-mercaptoetanol
- Adenosín monofosfato cíclico (AMPC) 1 nmol/ml en tampón fosfato 0,2 M, pH 6,5
- Somatostatina-14 (SST-14):
  - ✓ Se utiliza la SST-14 como inhibidor de la actividad AC a una concentración final de  $10^{-4}$  M, diluida en TEA 25 mM pH 7,4 que contiene 0,1 % de BSA.
- Forskolina:
  - ✓ Partiendo de una alícuota de forskolina (FK)  $10^{-2}$  M disuelta en DMSO, se hace una dilución con TEA 25 mM pH 7,4 hasta una concentración final de  $10^{-5}$  M.
- $^3\text{H}$ -AMPC:
  - ✓ Se diluye una preparación comercial de  $^3\text{H}$ -AMPC (sal amónica en solución de etanol 50:50) en tampón fosfato 0,05 M pH 6,5 para obtener una concentración final de 0,1 M. Se diluye esta solución de  $^3\text{H}$ -AMPC 1/16 en tampón fosfato 0,05 M pH 6,5.
- Curva estándar de AMPC:
  - ✓ Para construir la curva de calibrado, el AMPC frío se diluye con el medio de la curva (Figura 33). El rango de concentraciones de AMPC utilizado oscila entre 5 y 300 pmol/ml (eje de abscisas). En ordenadas se representa el porcentaje de  $^3\text{H}$ -AMPC unido a la PKA con respecto a la radiactividad total.



**Figura 33:** Curva estándar para la valoración de la producción de AMPC, por el método de la proteína enlazante



- Obtención de la proteína quinasa A:

✓ La obtención de la PKA se realiza según el protocolo descrito por Gilman (1970). La PKA se extrae de músculo de conejo. Los músculos de las extremidades y del dorso del conejo se trocean con tijeras y se homogeneizan en 2,5 volúmenes de EDTA 4 mM, pH 7 en un homogeneizador de aspas (*Omni-Mixer* de Dupont Instruments) a velocidad máxima, durante 2 minutos, en hielo. El homogeneizado se filtra a través de una gasa doble y el filtrado se centrifuga a 8000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se desecha el sedimento y el sobrenadante se centrifuga 30 minutos a 10000 x g a 4°C. Se desecha el sedimento resultante y el sobrenadante se ajusta a pH 6,1 con ácido acético 1 N. Se deja reposar la solución 1 hora en hielo para que se produzca la precipitación de las proteínas; el precipitado corresponde a la fosforilasa quinasa y a la glucógeno sintetasa. Posteriormente, se centrifuga la mezcla a 10000 x g durante 30 minutos a 4°C; se vuelve a desechar el precipitado y el sobrenadante se ajusta a pH 5,5 con ácido acético 1 N y se deja reposar en hielo 1 hora. Se vuelve a centrifugar la mezcla a 10000 x g durante 30 minutos a 4°C y, tras desechar el precipitado, el sobrenadante se ajusta a pH 6,8 con tampón fosfato potásico 1 M, pH 7,2. A continuación, se añade lentamente (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sólido (32,5 g por cada 100 ml de sobrenadante) para precipitar proteínas. Se mantiene la mezcla en agitación 2 horas, se centrifuga a 10000 x g durante 1 hora a 4°C y el precipitado se resuspende en 50 ml de Tris-HCl 5 mM, pH 7,5. La solución se coloca en una membrana de celulosa cerrada por los extremos superior e inferior y se dializa durante 48 h a 4°C en 20 volúmenes del mismo tampón, cambiando el tampón cada 12 horas. A las 48 horas, el dializado se centrifuga a 10000 x g durante 30 minutos a 4°C y se recoge el sobrenadante, que contiene la PKA. Se preparan alícuotas de 200 µl y se conservan a -20°C.

- Titulación de la proteína quinasa A:

✓ Previo a su uso, es necesario realizar una titulación de la PKA obtenida. Para ello, se preparan varias diluciones (1/10, 1/15, 1/20, 1/30, 1/40 y 1/50) y se valora su capacidad de unión al <sup>3</sup>H-AMPc en presencia de cantidades crecientes de AMPc frío (5, 10, 20, 30, 50, 100, 150 y 300 pmol/ml). En el caso de los resultados mostrados en la [Figura 34](#), se eligió la dilución 1/20 por presentar una sensibilidad adecuada para la valoración del AMPc.



● Suspensión de carbón activo:

- ✓ Con objeto de separar el <sup>3</sup>H-AMPC que no se ha unido a la PKA del unido, se prepara una suspensión de carbón activo 2,5% (p/v) y BSA 2% en tampón fosfato 0,05 M pH 6,5.

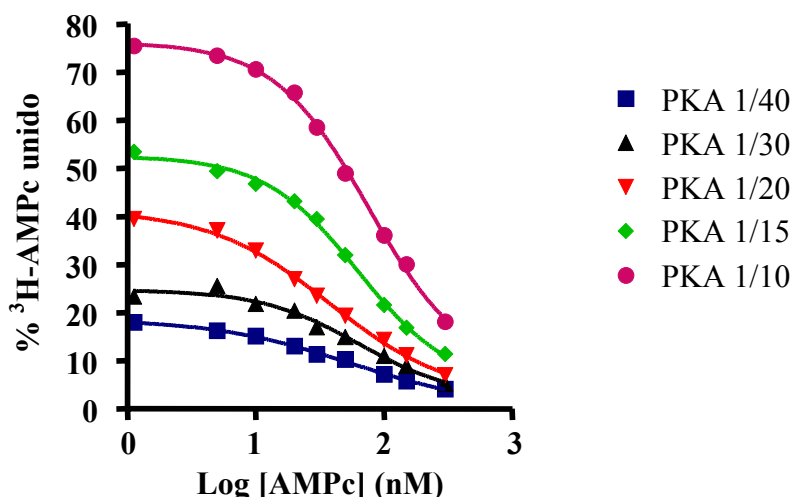


Figura 34: Curvas de desplazamiento de la unión de <sup>3</sup>H-AMPC a la PKA a diferentes diluciones de la misma

### 10.2. MÉTODO

Todas las pruebas se realizan por duplicado. Las membranas de hipocampo se incuban en un volumen final de 100 µl que contiene:

Tubo	10 µl	10 µl	50 µl
1,2 (Actividad basal)	TEA 25 mM	TEA 25 mM + 0,1 % BSA	CÓCTEL
3,4 (Inhibición de la act. basal)	TEA 25 mM	SST 10 <sup>-4</sup> M	CÓCTEL
5,6 (Actividad estimulada)	FK 10 <sup>-5</sup> M	TEA 25 mM + 0,1 % BSA	CÓCTEL
7,8 (Inhibición de la act. estimulada)	FK 10 <sup>-5</sup> M	SST 10 <sup>-4</sup> M	CÓCTEL

Se añaden a todos los tubos 20 µl de las membranas procedentes de hipocampo a una concentración de 0,3 mg/ml suspendidas en TEA 25 mM pH 7,4. La reacción se inicia añadiendo 10 µl de ATP a los tubos previamente atemperados (4-5 minutos). Tras una incubación de 15 minutos a 30°C en un baño con agitación, la reacción se detiene por



desnaturalización de las proteínas a 90° C durante 3 minutos. Se dejan enfriar los tubos y se añaden 200 µl de la suspensión de alúmina agitando en vórtex. Posteriormente, se centrifugan los tubos a 3200 x g durante 10 minutos a 4°C. Es necesario hacer diluciones de los sobrenadantes de las muestras (con el medio de dilución) para poder interpolarlos con fiabilidad en la curva de calibrado. Las diluciones recomendadas, para nuestro lote de PKA, fueron las siguientes:

- ✓ Basales e inhibidos de los basales: dilución 1/3
- ✓ Estimulados e inhibidos de los estimulados: dilución 1/15

Se toman 50 µl de los sobrenadantes de la curva estándar y 50 µl de las diluciones anteriores. Se añaden 50 µl de la PKA diluida y se incuban los tubos durante 90 minutos a 4°C para conseguir la unión del AMPc a la PKA. Posteriormente, se adicionan a los tubos 50 µl de <sup>3</sup>H-AMPc 6,25 mM y se incuban a 4° C durante 2 horas. A continuación, se añaden 150 µl de la suspensión de carbón activo (excepto a los dos tubos de actividad total) y se mantienen los tubos a 4°C durante 15 minutos. Se centrifugan los tubos a 3200 x g durante 10 minutos a 4° C. Se recogen 200 µl del sobrenadante resultante y se añaden a tubos que contienen 2 ml de líquido de centelleo, contándose la radiactividad presente en cada tubo en un contador β (Wallac Pharmacia 1410).

## **11. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOSFOTIROSINA FOSFATASA**

La determinación de la actividad fosfotirosina fosfatasa (PTP) se realiza conforme a una modificación del método descrito por Colás y col. (1992). En este método, se cuantifica el <sup>33</sup>P liberado a partir de un sustrato fosforilado, un polipéptido sintético formado por glutamina y tirosina en una proporción 4:1 [poli-(Glu:Tyr)].

Este poli-(Glu:Tyr) se fosforila en los residuos de tirosina gracias a la actividad tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), receptor que se encuentra sobreexpresado en las membranas de las células de la línea A-431. Esta línea celular deriva de un carcinoma epidérmico establecido a partir de tumores sólidos por Giard y col. (1973).



## **11.1. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS DE CÉLULAS A-431**

### **11.1.1. Reactivos**

- Medio de cultivo DMEM con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos
- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,0:
  - ✓ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM
  - ✓ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM
  - ✓ NaCl 150 mM
  - ✓ KCl 2.7 mM
- Tampón “C”:
  - ✓ Tris-HCl 50 mM pH 7,5
  - ✓ Inhibidor de tripsina de soja (STI) 0,03%
  - ✓ Bacitracina 0,5 mg/ml

### **11.1.2 Método**

Las células se cultivan en medio DMEM alcanzar el 100% de confluencia. Una vez confluentes, se lavan las células con PBS, se levantan con un raspador de goma y se recogen en este mismo tampón. A continuación se centrifugan los tubos a 150 x g durante 5 minutos a 4°C y se resuspenden las células en tampón “C”. Después, se lisan las células mediante choque térmico, congelando rápidamente a -80°C y descongelando en baño a 37°C. Una vez lisadas, se centrifugan los tubos a 150 x g durante 5 minutos, eliminándose en el sedimento núcleos y células muertas. El sobrenadante se centrifuga a 25000 x g durante 30 minutos y el sedimento, que contiene las membranas crudas, se resuspende en tampón “C” y se conserva a -80°C.

## **11.2. MARCAJE DEL POLI-(GLU:TYR) CON <sup>33</sup>P**

### **11.2.1. Reactivos**

- Tampón de marcaje:
  - ✓ Tris-HCl 50 mM pH 7,5
  - ✓ Ortovanadato de sodio 100 μM
  - ✓ MnCl<sub>2</sub> 5 mM
- Tampón de elución:
  - ✓ Tris-HCl 50 mM pH 7,5
  - ✓ Igepal CA-630 (Nonidet P-40) 0,01%



- Mezcla de marcaje (se prepara en el momento):
  - ✓ 1-2 mg de membranas de células A-431 en 507,5  $\mu\text{l}$  de tampón de marcaje
  - ✓ 213  $\mu\text{l}$  de tampón de marcaje
  - ✓ 7,2 mg de poli-(Glu:Tyr) en 150  $\mu\text{l}$  de tampón de marcaje
  - ✓ 10  $\mu\text{l}$  de Igepal CA-630 (Nonidet P-40) 10%
  - ✓ 66  $\mu\text{l}$  de EGF  $10^{-5}$  M en tampón de marcaje
  - ✓ 12,5  $\mu\text{l}$  de ATP 20 mM en tampón de marcaje
  - ✓ 41  $\mu\text{l}$  de  $\gamma$ -[ $^{33}\text{P}$ ]-ATP 250  $\mu\text{M}$  en tampón de marcaje (aprox 85  $\mu\text{Ci}$ )

### 11.2.2. Método

En un tubo Eppendorf, se prepara la mezcla de marcaje y se deja incubando a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas en rotación. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se deposita en una columna de Sephadex G-25 (medio) (PD-10 Amersham) a  $4^{\circ}\text{C}$  y se eluye con tampón de elución frío a un flujo de 0,20 ml/min. Se recogen fracciones de 500  $\mu\text{l}$ , se toma de cada fracción una alícuota de 10  $\mu\text{l}$ , se añaden 2 ml de líquido de centelleo y se llevan a un contador  $\beta$  (Wallac Pharmacia 1410). Se recogen las fracciones que contienen el  $^{33}\text{P}$ -poli-(Glu:Tyr) (Figura 35) y se concentran con un microconcentrador *Amicon Ultra 4* (Millipore). Tras concentrarse, se toma la fracción superior y se añade un volumen de tampón de elución. Se preparan alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  y se conservan a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el día del ensayo (máximo un mes).

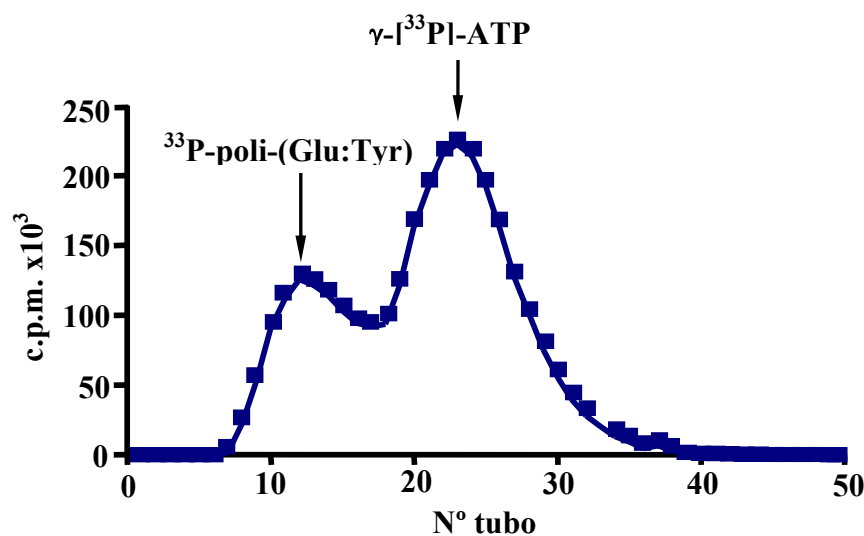


Figura 35: Purificación del  $^{33}\text{P}$ -poli-(Glu:Tyr) en una columna de Sephadex G-25





### **11.3. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOTIROSINA FOSFATASA**

#### **11.3.1. Reactivos**

- Tampón PTP:
  - ✓ Tris-HCl 50 mM pH 7,0
  - ✓ BSA 0,1 %
  - ✓ Ditioneitol 5 mM
  - ✓ STI 0,01 %
  - ✓ PMSF 0,1 mM
  - ✓ EDTA 1 mM
  - ✓ MgSO<sub>4</sub> 5 mM
- <sup>33</sup>P-poli-(Glu:Tyr) a una concentración de 1 μM (aprox 1000 c.p.m./μl)
- SQ 22536 (Inhibidor de la AC) 5x10<sup>-4</sup> M en tampón PTP
- SST 7x10<sup>-4</sup> M en tampón PTP
- Solución iniciadora (ATP 20 mM, GTP 12 μM en tampón PTP)
- BSA 0,5 mg/ml en tampón PTP
- Ácido tricloroacético (TCA) 30%
- Solución quelante:
  - ✓ Molibdato amónico 1%
  - ✓ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 210 mM
- Isobutanol:Tolueno (1:1)

#### **11.3.2. Método para valorar la actividad PTP basal**

Se añaden a tubos eppendorf por duplicado 70 μl de membranas procedentes de hipocampo resuspendidas en tampón PTP a una concentración de 0,5 mg/ml o bien 70 μl de BSA 0,5 mg/ml para los inespecíficos. Se atemperan los tubos 5 minutos a 30°C y se añade 30 μl de <sup>33</sup>P-poli-(Glu:Tyr) 1 μM (aproximadamente 30000 c.p.m.) agitando en vórtex. Se incuban los tubos durante 10 minutos en baño con agitación y, transcurrido este tiempo, se añaden a cada tubo 100 μl (un volumen) de TCA 30% para detener la reacción.

Se dejan reposar los tubos 30 minutos en hielo para que precipiten las proteínas y se centrifugan a 10000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se toman 150 μl del sobrenadante, donde se encuentra el <sup>33</sup>P liberado y se añade un volumen de solución quelante. Se incuban 10 minutos los tubos a 30°C, se añade 1 ml de isobutanol:tolueno y se agitan fuertemente en un



vórtex. Se centrifugan los tubos a 250 x g durante 5 minutos para que se formen dos fases, se toman 600  $\mu$ l de la fase orgánica superior, se añaden 2 ml de líquido de centelleo y se llevan a contar a un contador  $\beta$  (Wallac Pharmacia 1410).

La hidrólisis no enzimática (inespecífica) del sustrato fosforilado se corresponde con los tubos que llevan BSA en lugar de membranas de hipocampo y se resta de la actividad de las muestras para calcular la actividad PTP específica. Una unidad de actividad PTP puede definirse como la cantidad de enzima que libera 1 nmol de fosfato del sustrato marcado/min/mg proteína.

### **11.3.3. Método para valorar la actividad PTP estimulada por somatostatina**

Para poder valorar la actividad PTP estimulada por SST es necesario añadir al medio de ensayo ATP y GTP para que se produzca la activación de las proteínas  $G_i$  y de las PTP dependientes de la vía de la SST. No obstante, para evitar que el ATP sea transformado enzimáticamente a AMPc por la AC, retirándolo del medio, se hace necesario inactivar esta enzima con un inhibidor específico, el SQ 22536.

De cada muestra o inespecífico se realizan dos duplicados, uno de ellos para medir la actividad basal y otro para medir la actividad estimulada por SST. Se añaden a tubos tipo eppendorf 40  $\mu$ l de membranas de hipocampo a una concentración de 0,875 mg/ml, o bien 50  $\mu$ l de BSA 0,5 mg/ml para los inespecíficos, y 10  $\mu$ l de SQ 22536  $5 \times 10^{-4}$  M. Se preincuban 30 minutos a 30°C en baño con agitación para que se produzca la inhibición de la AC. A continuación, se van añadiendo a los tubos para medir la actividad basal 10  $\mu$ l de BSA 0,5 mg/ml y a los tubos para medir la actividad estimulada 10  $\mu$ l de SST  $7 \times 10^{-4}$  M. Finalmente, se añaden a todos los tubos 10  $\mu$ l de la solución iniciadora y se dejan incubando 10 minutos a 30°C en baño con agitación. Transcurrido este tiempo, necesario para la activación de la vía de la SST, se van añadiendo, en intervalos de 10 segundos, 30  $\mu$ l de  $^{33}\text{P}$ -poli-(Glu:Tyr) 1  $\mu$ M (aproximadamente 30000 c.p.m.), agitando en vórtex. El resto del procedimiento es similar al descrito en el apartado anterior.



## **12. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ARNm**

### **12.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL**

#### **12.1.1 Reactivos**

- Tri-Reagent
- Agua dietilpirocarbonato (DEPC):
  - ✓ Se añade DEPC en agua bidestilada hasta una concentración de 0,01%. Se deja toda la noche a 60°C, se autoclava y se guarda a temperatura ambiente protegido de la luz.
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol al 75%
  - ✓ Enrasamos a 100 ml con agua DEPC 78,125 ml de Etanol 96°.

#### **12.1.2. Método**

El ARN total se extrae de 50 mg de hipocampo de acuerdo con el protocolo de Tri-Reagent proporcionado por Sigma. Las muestras se homogeneizan a temperatura ambiente en 1 ml de Tri-Reagent utilizando un homogeneizador Potter con vástago de teflón autoclavado. A continuación se añaden 200 µl de cloroformo, se agitan fuertemente las muestras durante 15 segundos y se mantienen durante 10 minutos a temperatura ambiente para deshacer los complejos de nucleoproteínas. Transcurrido ese tiempo, se centrifugan los tubos a 12000 x g 15 minutos a 4°C. Se transfiere la fase acuosa superior a tubos nuevos y se le añade 500 µl de isopropanol. Se agitan los tubos con suavidad y se mantienen otros 10 minutos a temperatura ambiente para que el ARN precipite. A continuación, se centrifugan 10 minutos a 12000 x g y se descarta el sobrenadante. El precipitado se lava dos veces con 1 ml de etanol al 75%. Finalmente se dejan secar los precipitados a temperatura ambiente y se resuspenden en 50 µl de agua DEPC.

### **12.2. PURIFICACIÓN DEL ARN TOTAL CON ADNasa I**

Debido a que la extracción con el TriReagent puede dejar trazas de ADN genómico en las muestras, es necesario someterlas a una digestión con ADNasa I y a una posterior fenolización para purificar las muestras y mejorar la especificidad de la PCR.

**12.2.1. Reactivos**

- ADNasa I
- Tampón ADNasa I 10X:
  - ✓ Tris-HCl 500 mM pH 7,6 y MgCl<sub>2</sub> 500 mM en agua DEPC
- Tampón de parada 10X:
  - ✓ EDTA 500 mM pH 8,0 y SDS 2% en agua DEPC
- Fenol:
  - ✓ Antes de usar el fenol, hay que saturarlo con Tris-HCl pH 8,0 para mejorar la extracción del ARN. Para ello, se añade un volumen de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 y se agita la mezcla durante 15 minutos. Una vez separadas las dos fases se aspira la fase acuosa y se comprueba que el pH del fenol es igual o superior a 8,0 con papel de tornasol, repitiendo el proceso si fuera preciso. Finalmente, se añaden 0,1 volúmenes de la solución de Tris para conservar el fenol.
- Cloroformo
- Alcohol isoamílico
- Acetato sódico 3 M
- Etanol al 75%
- Etanol 96° frío

**12.2.2. Digestión con ADNasa I**

Tras determinar la concentración de ARN mediante la absorbancia a 260 nm, se toman 20 µg de muestra y se añaden a un tubo que contiene 10 µl de Tampón ADNasa I y 10 µl (100 UI) de ADNasa I en un volumen final de 100 µl. Se homogeneiza cada mezcla de reacción por pipeteos sucesivos y se incuba a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añaden 10 µl de tampón de parada 10X, se mezclan y se incuban los tubos 10 minutos más a 37°C.

**12.2.3. Purificación con fenol**

Una vez detenida la reacción de digestión, se añade a cada tubo un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (1:1:0,02) y se agita el tubo con un vórtex durante 30 segundos. A continuación, se centrifugan las muestras 15 minutos a 12000 x g y se recogen los sobrenadantes. Se añaden 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol frío y, tras agitar suavemente, se incuban las muestras toda la noche a -20°C para que



el ARN precipite. Al día siguiente se centrifugan los tubos a 12000 x g 15 minutos a 4°C y se descartan los sobrenadantes. Los precipitados se lavan dos veces con 1 ml de etanol al 75% y, finalmente, se dejan secar a temperatura ambiente y se resuspenden en agua DEPC.

### **12.3. COMPROBACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ARN**

#### **11.3.1. Reactivos**

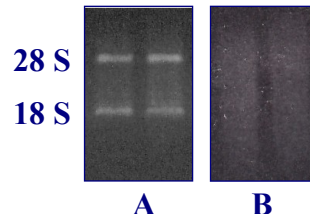
- MOPS 10X:
  - ✓ MOPS 200 mM
  - ✓ Acetato sódico 50 mM
  - ✓ EDTA 10 mM
- Tampón de muestras desnaturizante:
  - ✓ 12% Agua DEPC
  - ✓ 50% Formamida desionizada
  - ✓ 10% MOPS 10X
  - ✓ 7% Formaldehído
  - ✓ 1% Bromuro de etidio 1mg/ml
  - ✓ 20% Azul de bromofenol (0,2 mg/ml) disuelto en glicerol:agua DEPC (1:1)
- Gel desnaturizante de agarosa al 1%:
  - ✓ 1% Agarosa
  - ✓ 10% MOPS 10X
  - ✓ 5% Formaldehído
  - ✓ 84% Agua DEPC

#### **12.3.2. Método**

Una vez aislado y purificado el ARN total, se comprueba la integridad del mismo. Para ello se toma 1 µg de ARN al que le añadimos 2 µl de tampón de muestras desnaturizante para después enrasar a 12 µl finales con agua DEPC. Las muestras se calientan entonces a 70°C durante 5 minutos para desnaturizar el ARN y se enfrían rápidamente en hielo para evitar la renaturalización. A continuación, se cargan las muestras en un gel desnaturizante de agarosa al 1% y se realiza una electroforesis a 150 voltios. Por último, se visualiza el gel en un transiluminador ultravioleta. Si el ARN está intacto se observarán dos bandas correspondientes al ARN ribosómico (ARNr) de 18 y 28 Svedberg



(S), siendo la banda de 28 S el doble que la de 18 S (Figura 36A). Si, por el contrario, el ARN se ha degradado, aparecerán bandas secundarias o una mancha difusa (Figura 36B)



**Figura 36: Película representativa de la integridad del ARN.** En el panel A se pueden observar las dos bandas intactas correspondientes al ARNr de 28 S y 18 S mientras que en el panel B se observa una mancha difusa que se produce debido a la degradación del ARN.

#### 12.4. AISLAMIENTO DEL ARNm A PARTIR DEL ARN TOTAL

Una técnica habitual en el análisis de la expresión mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es diseñar cebadores a ambos lados de un intrón y correr las muestras en un gel de agarosa. Si la extracción de ARNm no ha sido buena y han quedado restos de ADN genómico, aparecerán dos bandas muy próximas para el mismo amplicón, una correspondiente al ARNm y otra al ADN genómico que, al mantener el intrón, presenta un mayor tamaño. Sin embargo, algunos de los genes de los receptores de somatostatina (SSTR) no poseen intrones intercalados en su región codificante, por lo que la única manera de asegurar la no existencia de ADN genómico en la muestra es purificarla con un método que permita extraer selectivamente el ARNm. En este trabajo se ha utilizado para este fin el kit comercial *GenElute mRNA miniprep* de Sigma.

##### 12.4.1. Contenido del kit

- Agua estéril
- Columnas de filtración
- Microesferas de poliT
- Solución de unión 2X
- Tampón de lavado
- Tampón de elución



### **12.4.2. Método**

Las muestras de ARN total se diluyen hasta un volumen final de 250  $\mu$ l con agua estéril. A continuación, se añaden a las muestras 250  $\mu$ l de solución de unión 2X y 15  $\mu$ l de microesferas de poliT que se unen a la cola de poliA característica del ARNm. Se incuban los tubos 3 minutos a 70°C para desnaturalizar el ARN y se deja enfriar a temperatura ambiente durante otros 10 minutos, durante los cuales se produce la unión del ARNm a las microesferas. Se centrifugan las muestras a 15000 x g durante 2 minutos y se descarta el sobrenadante, que contiene el ARN no mensajero y los posibles restos de ADN. El precipitado se resuspende en tampón de lavado y se transfiere a columnas de filtración. Tras una nueva centrifugación a 15000 x g durante 2 minutos, las microesferas con el ARNm quedan retenidas en el filtro. A continuación, se lavan los filtros con 500  $\mu$ l de tampón de lavado y se añaden 50  $\mu$ l de tampón de elución calentado a 70°C para disociar el ARNm de las microesferas. Tras una incubación de 5 minutos a 70°C, los tubos se centrifugan de nuevo a 15000 x g durante 1 minuto y se recoge el eluido, que contiene el ARNm puro.

## **13. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA**

En este estudio, se analiza el grado de expresión génica mediante el uso de técnicas basadas en la PCR. Dado que el ADN es una molécula mucho más estable que el ARN, el primer paso consiste en transformar, mediante una reacción de transcripción inversa o retrotranscripción (RT), el ARN a ADN.

### **13.1. REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN**

#### **13.1.1. Reactivos**

- Agua estéril
- Cebadores oligo(dT)<sub>12-18</sub> (0,5 mg/ml)
- Mezcla de dNTP (10 mM cada uno, en agua estéril)
- Tampón 5X:
  - ✓ Tris-HCl 250 mM pH 8,3
  - ✓ KCl 375 mM
  - ✓ MgCl<sub>2</sub> 15 mM
- *Rnase Out* (Inhibidor recombinante de ARNasas, 40 UI/ $\mu$ l)
- Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT)
- Ditioneitol (DTT) 100 mM



### 13.1.2. Método

A 5 µg de ARN se le añaden 1 µl de los Cebadores oligo(dT), 1 µl de la mezcla de dNTP y agua estéril hasta un volumen de 12 µl. Esta mezcla se incuba en un baño seco a 65°C durante 5 minutos y se enfría rápidamente en hielo para desnaturalizar el ARN. A continuación, se le añaden 4 µl de tampón 5X, 2 µl de DTT 100 mM y 1 µl de inhibidor de ARNasas. Se mezcla la muestra suavemente por pipeteos sucesivos y se preincuba a 37°C durante un minuto. Una vez preincubada la mezcla, se añade 1 µl de MMLV-RT y se incuba a 37°C durante 50 minutos. Finalmente, para detener la reacción, se calientan las muestras a 70°C durante 5 minutos.

## 13.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA SOMATOSTATINA

Los niveles de ARNm de SST se analizaron mediante la técnica de Southern-Blot a partir del ADNc obtenido por la reacción de RT y amplificado mediante PCR.

### 13.2.1. PCR

#### 13.2.1.1. Reactivos

- Agua estéril
- Tampón 10X:
  - ✓ Tris-HCl 75 mM pH 9,0
  - ✓ KCl 50 mM
  - ✓ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM
  - ✓ MgCl<sub>2</sub> 2 mM
- Taq polimerasa (5UI/µl)
- Cebadores (20 µM, ver Tabla 14)
- Mezcla de dNTP (10 mM cada uno, en agua estéril)
- BSA 10 µg/µl

Genes	Sentido 5'-3'	Antisentido 5'-3'	Tamaño del amplicón
SST	GAC CCA CCG CGC TCA AGC TCG GCT G	TTG TCC TAC ACT TAC AGA AGG TCT T	356 pb
β-actina	TGA CCC AGA TCA TGT TTG AGA	ATT CCA TAC CCA GGA AGG A	484 pb

**Tabla 14: Relación de cebadores** utilizados para la amplificación del ARNm de la SST y de la β-actina y tamaño de los amplicones en pares de bases (pb)





### **13.2.1.2. Método**

Se añade a tubos de termociclador 2  $\mu$ l del producto de reacción de la RT, 5  $\mu$ l de Tampón 10X, 1  $\mu$ l de cada uno de los cebadores, 1  $\mu$ l de la mezcla de dNTP, 1  $\mu$ l de BSA, 2,5 UI de Taq polimerasa y agua estéril hasta un volumen final de 50  $\mu$ l. A continuación, se lleva a cabo la reacción de amplificación bajo las siguientes condiciones:

- 95°C durante 5 minutos
- 30 ciclos de: 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto 30 segundos.
- 72°C durante 10 minutos.

### **13.2.2. Southern-Blot**

#### **13.2.2.1. Reactivos**

- Agarosa.
- TAE 50X:
  - ✓ Tris-acético 2 M pH 8,0
  - ✓ EDTA 50 mM
- Tampón de carga 6X:
  - ✓ EDTA 60 mM pH 8,0
  - ✓ 60% Glicerol
  - ✓ 0,2 % Azul de Bromofenol
  - ✓ 0,2 % Xilen-cianol
- Membranas de Nylon.
- SSC 20X pH 7,0:
  - ✓ Cloruro sódico 3 M
  - ✓ Citrato sódico 0,3 M
- Solución desnaturalizante:
  - ✓ NaCl 1,5 M
  - ✓ NaOH 0,5 N
- Solución de neutralización:
  - ✓ Tris-HCl 1 M pH 7,4
  - ✓ NaCl 1,5 M



- Solución Denhardt's 50X:
  - ✓ 2 % BSA
  - ✓ 2 % Ficoll 70
  - ✓ 2 % Polivinilpirrolidona
- Solución de Hibridación (se prepara en el día y se pasa por un filtro de 0,45 µm):
  - ✓ SSC 6X
  - ✓ Denhardt's 10X
  - ✓ 0,5 % SDS
  - ✓ 50 % Formamida desionizada
  - ✓ ADN de esperma de salmón 1 µg/ml
- Kit de Marcaje *Rediprime II* (Amersham)
- [<sup>32</sup>P]-dCTP
- Sonda específica anti SST (5'-TTC GAG TTG GCA GAC CTC TGC AGC TCC AGC CT-3')

#### 13.2.2.2. Electroforesis y transferencia

A cada tubo de reacción de PCR se le añaden 10 µl de tampón de carga 6X y se corren las muestras en un gel en gradiente de agarosa (2%, 1,5% y 1%) en TAE 1X a 120 V hasta que la banda del azul de Bromofenol sobrepasa la mitad del gel al 1%. Se corta el gel al 1% y se desecha el resto. Se desnaturaliza el ADN sumergiendo el gel durante 45 minutos, con agitación suave, en 10 volúmenes de solución desnaturalizante y, a continuación, se neutraliza el gel lavándolo dos veces durante 20 minutos en tampón de neutralización. Finalmente, se transfiere el ADN, por capilaridad, a una membrana de Nylon durante una noche en tampón SSC 10X a temperatura ambiente y, una vez completada la transferencia, se deja secar la membrana y se introduce en el microondas durante 2 minutos a máxima potencia (750-900 W) para fijar el ADN. Las membranas pueden usarse al momento o guardarse en frío entre papel de filtro autoclavado hasta su uso.

#### 13.2.2.3. Hibridación

Se humedece la membrana en SSC 6X y, a continuación, se introduce en un tubo de hibridación que contiene solución de hibridación (aproximadamente 200 µl/cm<sup>2</sup> de membrana) durante 1 hora a 42°C. Mientras tanto, se prepara la sonda. Para ello, se añade a un tubo tipo eppendorf, estéril, 3 µl (300 pmol) de la sonda específica y se enrasa a 45 µl con



agua estéril. Se calienta la muestra a 100 °C durante 5 minutos para desnaturalizar el ADN y se enfría rápidamente en hielo para evitar la renaturalización. Se transfiere la sonda desnaturalizada a un tubo del kit que contiene una mezcla de marcaje compuesta por una mezcla de tres desoxirribonucleótidos (dATP, dGTP y dTTP), la enzima de Klenow libre de endonucleasas y cebadores aleatorios de nueve nucleótidos. Una vez homogeneizado, se añaden 35 µCi de [<sup>32</sup>P]-dCTP y se incuba la muestra a 37°C durante 15 minutos, deteniendo la reacción en hielo. La sonda, ya marcada con <sup>32</sup>P, se vuelve a desnaturalizar 5 minutos a 100°C y, finalmente, se añade al tubo que contenía la membrana y la solución de hibridación, dejándola toda la noche a 42°C en agitación suave. A la mañana siguiente, se realizan lavados sucesivos, cada vez menos astringentes, para eliminar los restos de sonda marcada no unida así como la unida de manera inespecífica, controlando entre lavado y lavado la radiactividad presente en la membrana con un detector Geiger-Müller. En primer lugar, se hace un lavado con SSC 2X durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizan dos lavados con SSC 2X 1% SDS a 65°C durante 15 minutos y, finalmente, un último lavado con SSC 0,1X a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las membranas, una vez lavadas, se dejan secar por completo y se meten entre papel de filtro para evitar contaminaciones. Por último, se dejan exponiendo durante 24 – 48 horas a -70°C.

### **13.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL**

Los niveles de ARNm de los SSTR se analizan mediante PCR a tiempo real utilizando el kit *Quantimix Easy SYG* de Biotools. Dicho kit se basa en la señal que emite un fluorocromo, el *Sybr Green<sup>TM</sup>*, al intercalarse entre la doble hélice del ADN. Por tanto, aunque en ocasiones puede presentar una cierta inespecificidad debido a la reacción con dímeros de cebadores, tiene las ventajas de ser más barato que los kits basados en sondas fluorescentes, de presentar una mayor eficiencia por reacción y de poder usarse el mismo kit para distintos genes, variando los cebadores.

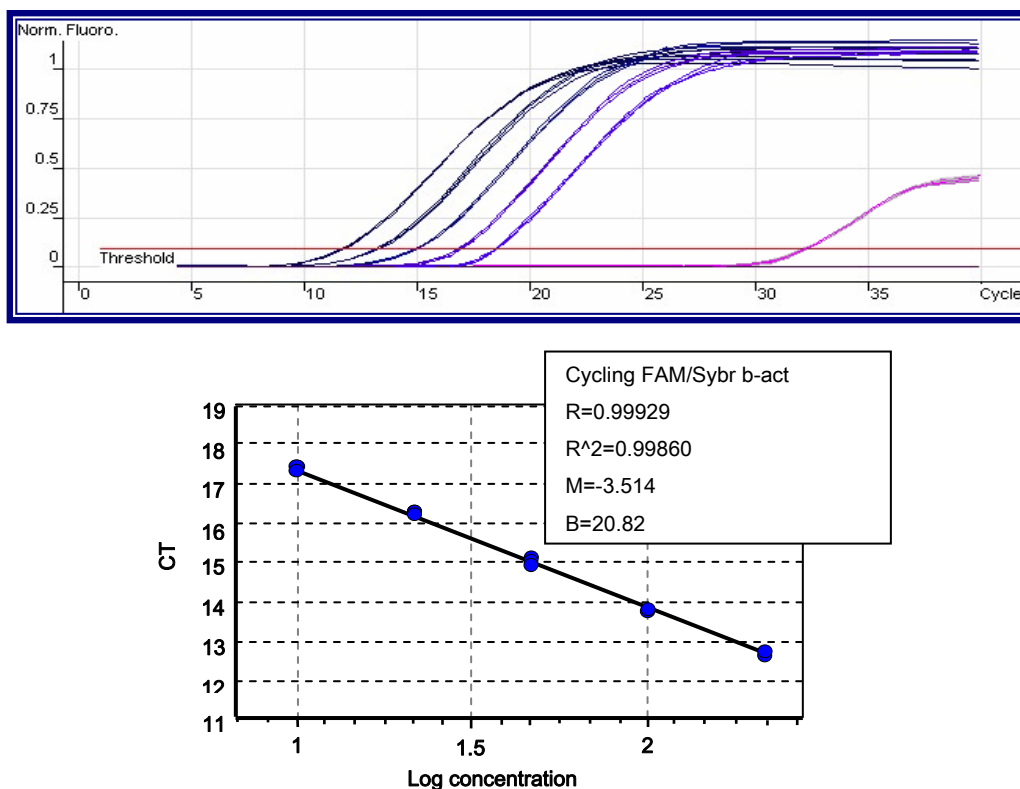
Los cebadores para los distintos SSTR y el gen de control ( $\beta$ -actina) fueron diseñados con el programa *Beacon Designer 5.1* (Premier Biosoft International) y las condiciones de la reacción se optimizaron hasta obtener eficacias de reacción próximas al 90% (Figura 37). Para ello, se realizaron diluciones seriadas de una muestra de ADNc y se representaron en una gráfica las  $C_T$  (el número de ciclo en que la señal de fluorescencia supera un umbral) frente al logaritmo de la concentración de ADNc total. La pendiente de la recta obtenida por regresión lineal nos permite calcular la eficiencia de la reacción con la fórmula:



$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}]$$

Para valorar la especificidad de los cebadores se analizan las curvas de disociación de cada ensayo, comprobándose que no existe más que un pico de caída de fluorescencia correspondiente a la temperatura de desnaturalización del amplicón. Además, mediante electroforesis de las muestras en gel de agarosa y posterior visualización de las bandas en un transiluminador U.V., se comprueba que el peso molecular del amplicón se corresponde con el esperado.

Dado que las eficiencias de las reacciones de amplificación para cada gen analizado resultan ligeramente diferentes, se utiliza el método de Pfaffl (2001) para realizar la cuantificación relativa de los mismos. Según este método, la ratio entre la concentración del ADN del gen problema (SSTRx) y la del ADN del gen de referencia ( $\beta$ -actina) de cada muestra con respecto al grupo control, viene definida por la ecuación de la Figura 38.



**Figura 37. Panel superior:** Curvas de amplificación de ADN obtenidas al amplificar el ARNm del gen de la beta actina ( $\beta$ -act) a partir de una dilución seriada de una muestra de ADNc. En distintos tonos de azul se ven las curvas correspondientes a la amplificación de la  $\beta$ -act. En color violeta se aprecia el control negativo de la reacción. Cada muestra se amplificó por triplicado. **Panel Inferior:** Recta de regresión obtenida al representar las C<sub>T</sub> de la reacción anterior frente al logaritmo de la concentración de ADN total (ng/reacción).



$$\text{Ratio} = \frac{(E_{SSTRx})^{\Delta C_T SSTRx(\text{control-muestra})}}{(E_{\beta\text{-actina}})^{\Delta C_T \beta\text{-actina}(\text{control-muestra})}}$$

**Figura 38:** Ecuación de Pfaffl aplicada al análisis de la expresión génica de los distintos receptores de somatostatina (SSTRx). E expresa la eficiencia de la reacción para cada gen analizado y  $\Delta C_T$  es el resultado de restar la  $C_T$  de la muestra a la  $C_T$  del control.

### 13.3.1. Reactivos

- Agua estéril
- Cebadores (10  $\mu\text{M}$ , ver Tabla 15)
- Kit *Quantimix Easy Syg*
- ADNc obtenido por RT a partir del ARNm purificado mediante el kit *GenElute mRNA miniprep* (ver apartado 12.4)

Genes	Sentido 5'-3'	Antisentido 5'-3'
<b>SSTR1</b>	GTT CCA GTG ACA AAC CGC AGA G	TTA TTA GGC ACC GCT TGA AAG GC
<b>SSTR2</b>	TCC AAC CAG ACA GAG CCA TAC TAC	ACC ACG CAC ACC ACG AAG TAG
<b>SSTR3</b>	TTG GGC TAG TTG GCT GCT GAC	AGG CAC GGA TGA AGG ATA GGT AAC
<b>SSTR4</b>	TTC AAG AGG CAG GAA GCA GGT G	TCA CAA GTC ACA CAA GGG TAG GC
<b><math>\beta</math>-actina</b>	TGA CCC AGA TCA TGT TTG AGA	ATT CCA TAC CCA GGA AGG A

**Tabla 15:** Relación de cebadores utilizados para la amplificación del ARNm de los receptores de somatostatina (SSTRx) y de la  $\beta$ -actina

### 13.3.2. Método

Los productos de la reacción de RT se diluyen 1/5 en agua estéril para facilitar su manejo y evitar errores de pipeteo. Se añade en tubos de termociclador, por triplicado, 2,5  $\mu\text{l}$  de la dilución 1/5 del ADNc, 1  $\mu\text{l}$  de cebadores (concentración final 0,5  $\mu\text{M}$ ), 10  $\mu\text{l}$  del *Quantimix Easy Syg* y agua estéril hasta completar 20  $\mu\text{l}$ . A continuación se realizan 40 ciclos de amplificación en un termociclador *Rotor-Gene 3000* (Corbett Research) seguidos de un ensayo de disociación conforme a las condiciones expuestas en la [Tabla 16](#).



Gen	Desnat. Inicial	40 ciclos			Disociación	Tamaño amplicón	E <sub>SSTRx</sub>	E <sub>β-actina</sub>
		Desnat.	Anillamiento	Extensión				
SSTR1	95° - 10'	95° - 30''	55° - 30''	72° - 45''	55° - 95°	99 pb	1,85	1,92
SSTR2		95° - 30''	56° - 30''	72° - 30''		5''/grado	77 pb	1,90
SSTR3					71 pb		1,87	
SSTR4		61 pb	1,84					
β-actina	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a		111 pb	n/a

**Tabla 16:** Condiciones de reacción, tamaños del amplicón y eficiencias para la amplificación del ARNm de los receptores de somatostatina (SSTRx) y de la β-actina. (Desnat.: desnaturalización; pb: pares de bases)

## 14. MEDIDA DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

Como medida del grado de peroxidación lipídica, se valoran los niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (ATB) conforme al método de Ottolenghi (1959).

### 14.1. REACTIVOS

- Ácido tricloroacético (TCA) 10%
- ATB 0,67%:
  - ✓ Se disuelven 67 mg de ATB en 1 ml de DMSO y se enrasan a 10 ml con agua bidestilada.
- 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMOP) 500 μM
  - ✓ Se diluye primero el TMOP en 1 ml de etanol y, posteriormente, se enrasa a 50 ml con agua bidestilada.

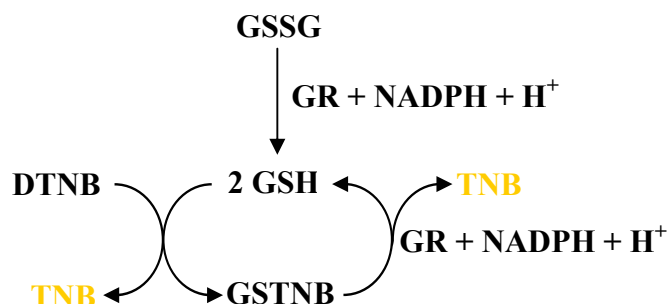
### 14.1. MÉTODO

Se toman 100 μl de fracción soluble en tubos tipo eppendorf y se añaden 200 μl de TCA 10% frío para que precipiten las proteínas. Se dejan reposar las muestras 20 minutos en hielo y se centrifugan 10 minutos a 11000 x g a 4°C. Mientras tanto, se prepara la recta de calibrado. Para ello, partiendo de la solución de TMOP 500 μM, se prepara una serie de concentraciones que van desde 0 a 100 μM en agua bidestilada. Por último, se toman 200 μl de cada patrón y de las muestras y se añade un volumen de la solución de ATB 0,67%. Se incuban los tubos en agua hirviendo durante 10 minutos, se dejan enfriar y se lee la absorbancia a 535 nm. Los resultados se expresan en μM de malondialdehído por mg de proteínas totales.



## 15. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATION

Los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) se miden utilizando el método cíclico de Griffith (1980). En este método, el GSSG es reducido enzimáticamente por la glutatión reductasa (GR) y NADPH para generar GSH, el cual reacciona con el reactivo de Ellman (DTNB, ácido-5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) para formar ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB, de color amarillo) y un producto de transición formado por GSSG y TNB (GSTNB). Este producto es reducido nuevamente por la GR y NADPH para formar una molécula de TNB y regenerar el GSH (Figura 38). La cantidad de TNB formado, medible espectrofotográficamente a 412 nm, será proporcional a la cantidad de glutatión total (GSx, suma del GSH y el GSSG) presente en la muestra. Los resultados se refieren a una recta de calibrado realizada con concentraciones conocidas de GSH (0–200  $\mu\text{M}$ ). Para conocer de manera específica la cantidad de glutatión oxidado, se añade a cada muestra un producto enmascarador, la 4'-vinil-piridina (4-VP), que reacciona de manera covalente con los grupos tiol reducidos, retirando así el GSH de la reacción. En este caso, los resultados se interpolan en una recta de calibrado con concentraciones conocidas de GSSG (0-20  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 38:** Representación de la reacción cíclica para la determinación de los niveles de glutatión. GSSG, glutatión oxidado; GSH, glutatión reducido; GR, glutatión reductasa; DTNB, 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico); TNB, ácido 5-tio-2-nitrobenzoico; GSTNB, producto de transición proveniente de la reacción del GSH con el DTNB.

### 15.1. REACTIVOS

- Tampón fosfato-EDTA pH 7,0:
  - ✓ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM
  - ✓ EDTA 1 mM
  - ✓ Se ajusta el pH con NaOH 1 M
- Ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) en agua bidestilada
- GSH



- GSSG
- 4-VP 1 M (disuelta en etanol)
- Glutation reductasa (GR)
- NADPH
- DTNB
- Solución de ensayo (se prepara en el día):
  - ✓ NAPDH 0,30 mM
  - ✓ DTNB 0,225 mM
  - ✓ GR 1,6 UI/ml
- NaOH 4 N

## 15.2. MÉTODO

### 15.2.1. Extracción del glutatión

Para evitar interferencias con otras enzimas presentes en el citosol, antes de realizar el ensayo hay que eliminar las proteínas de las muestras. Para ello, se añade a tubos tipo eppendorf que contienen 100  $\mu$ l de fracción soluble de hipocampo, un volumen de TCA 20%. Se dejan reposar los tubos 20 minutos en hielo para que precipiten las proteínas y se centrifugan a 11000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se recogen los sobrenadantes, que contienen el glutatión, en tubos Eppendorf nuevos y se conservan a -80°C hasta el momento de su uso.

### 15.2.2. Determinación de los niveles de glutatión total (GSx)

Se prepara una curva de calibrado con concentraciones crecientes de GSH (0-200  $\mu$ M) en agua destilada y, a continuación, se añade a cada tubo un volumen de TCA 20%. Se toma una alícuota de cada tubo de la curva y de las muestras y se diluye 1/50 con tampón fosfato/EDTA para medir el GSx.

El ensayo se realiza en una placa de 96 pocillos. En cada pocillo y por duplicado, se añaden 50  $\mu$ l de cada patrón y de las muestras y, una vez montada la placa, se añaden con una pipeta multicanal 100  $\mu$ l de la solución de ensayo por pocillo. Se incuba la placa 5 minutos a 37°C y se lee la absorbancia de cada pocillo en un lector de placas a 405 nm<sup>8</sup>.

---

<sup>8</sup> Pese a que la máxima absorbancia del TNB se produce a una longitud de onda de 412 nm, la mayoría de los lectores de placas vienen con filtro de 405 nm, de ahí que a la hora de realizar el ensayo sea ésta la longitud de onda utilizada.





### **15.2.3. Determinación de los niveles de glutatión oxidado (GSSG)**

Se prepara una curva de calibrado con concentraciones crecientes de GSSG (0-20  $\mu\text{M}$ ) en agua destilada y, a continuación, se añade a cada tubo de la curva un volumen de TCA 20%. Se toma una alícuota de cada tubo de la curva y de las muestras y se diluye 1/5 con tampón fosfato/EDTA que contiene 4-VP a una concentración 10 veces mayor que el GSx medido en el apartado 15.2.2. y NaOH a una concentración final de 0,2 N. Se incuban los tubos 1 hora a temperatura ambiente para que la 4-VP reaccione con el GSH y se prepara la placa de 96 pocillos conforme a lo descrito en el apartado anterior para medir el GSx. Los resultados de esta medición se restan a los obtenidos en el apartado anterior para conocer específicamente la cantidad de GSH.

## **16. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA (CAT)**

Para medir la actividad CAT se utiliza una modificación del método de Aebi y col. (1984). Este método se basa en la disminución de la absorbancia a 240 nm que se produce por la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ , por la acción de la CAT. Esta disminución de la absorbancia ( $-\Delta\text{Abs}$ ) recibe el nombre de “k”. La actividad CAT se expresa como k/mg proteína según Aebi y col (1985).

### **16.1. REACTIVOS**

- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,0:
  - ✓  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM
  - ✓  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,76 mM
  - ✓ NaCl 150 mM
  - ✓ KCl 2,7 mM
- $\text{H}_2\text{O}_2$  19 mM

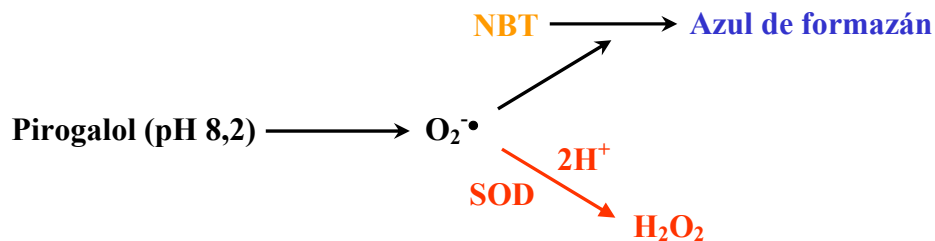
### **16.2. MÉTODO**

Se añaden 100  $\mu\text{l}$  de la fracción citosólica a 900  $\mu\text{l}$  de PBS en una cubeta de cuarzo. A continuación, se añade 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  19 mM y se mide la absorbancia a 240 nm durante 5 minutos. Para descartar la descomposición espontánea del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se realiza el mismo ensayo añadiendo a cada tubo 100  $\mu\text{l}$  de agua destilada en lugar de muestra, restándose esta “k” inespecífica a los valores obtenidos con cada muestra.



## 17. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

Para este trabajo, se ha medido la actividad SOD conforme al método descrito por Minami y Yoshikawa (1979). En él, la autooxidación química en medio básico del pirogalol genera radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que va a reducir un colorante, el azul de nitrotetrazolio (NBT), de color amarillo, a azul de formazán, de color azul. La presencia de SOD en el medio transforma el radical superóxido en  $H_2O_2$ , evitando así la reducción del NBT (Figura 39). Por lo tanto, en este método se mide la inhibición en la formación de azul de formazán mediante espectrofotometría a 540 nm frente a un inespecífico en el que no existe SOD. Se considera como una unidad de actividad de SOD a la actividad de esta enzima capaz de producir un 50% de inhibición sobre la reducción del NBT, según la definición de McCord y Fridovich (1969).



**Figura 39:** Esquema de la reacción del radical superóxido con el azul de nitrotetrazolio (NBT). En rojo se destaca la vía alternativa generada por la presencia de la superóxido dismutasa (SOD) en el medio.

### 17.1. REACTIVOS

- Etanol
- Cloroformo
- Tris 1 M
- HCl 1 M
- Tampón Tris-cacodílico pH 8,2:
  - ✓ Cacodilato sódico 1%
  - ✓ DPTA 1,6 mM
  - ✓ Se ajusta el pH con la solución de Tris 1 M. Se guarda en frío y se comprueba su pH periódicamente, desechando la solución si el pH desciende de 8,2
- Solución de pirogalol 3,6 mM (disuelto en HCl 1 M)
- Solución de Triton X-100 al 16% (en agua bidestilada)



- Solución de NBT 0,98 mM
- Solución de parada pH 3,5:
  - ✓ Ácido fórmico 2 M
  - ✓ Triton X-100 1,5%
  - ✓ Se ajusta el pH con ácido fórmico y se guarda en frío

## **17.2. MÉTODO**

### **17.2.1. Extracción de la enzima**

Se añaden 300 µl de agua bidestilada a tubos Eppendorf que contienen 200 µl de extracto de citosol o 200 µl de agua destilada para los inespecíficos. A continuación, se añaden 500 µl de etanol frío y 250 µl de cloroformo, agitando la mezcla fuertemente en un vórtex durante 2 minutos y medio, siendo este paso fundamental para la correcta extracción de la enzima. Después, se centrifugan los tubos a 18000 x g durante 1 hora a 4°C y, por último, se transfiere la fase superior a tubos limpios, conservándose a -20°C hasta su uso (máximo 3 meses). Se desechan los extractos que presenten turbidez o coloración.

### **17.2.2. Medida de la actividad SOD**

La medida de la actividad SOD se realiza en hielo y por duplicado para cada muestra. Para dicha determinación se añaden a cada tubo 500 µl de tampón Tris-cacodílico, 100 µl de Triton X-100 16%, 150 µl de muestra o de inespecífico y 250 µl de solución de NBT. Para iniciar la reacción, se añaden 10 µl de la solución de pirogalol diluida 1:1 con agua bidestilada y se agita. Se hace una primera medición de absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm y, seguidamente, se incuba durante 5 minutos a 37°C en oscuridad para que la enzima actúe. Pasado este tiempo, se añaden 100 µl de solución de parada y se agita, realizando una segunda medición a la misma longitud de onda (540 nm).

## **18. TINCIÓN *IN SITU* DE NÚCLEOS APOPTÓTICOS**

En este trabajo, se ha usado la técnica del TUNEL (Marcaje del extremo 3'-OH libre por la desoxinucleotidil transferasa terminal), descrita por Gavrieli y col. (1992), para marcar los núcleos apoptóticos del hipocampo. Esta técnica se basa en la capacidad de una enzima, la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT, por sus siglas en inglés), para añadir nucleótidos al extremo 3'-OH terminal de una cadena de oligonucleótidos. Dado que, durante la apoptosis, se produce una fragmentación del ADN por la acción de las endonucleasas, las



células apoptóticas presentan un elevado número de extremos 3'-OH libres sobre los cuales la TdT puede actuar. En la técnica del TUNEL utilizada en este trabajo, se ha utilizado una mezcla de nucleótidos biotinilados a los cuales se une estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano. La reacción de esta enzima con un cromógeno soluble, la diaminobenzidina (DAB), y  $H_2O_2$  vuelve insoluble y de color marrón el cromógeno, por lo que se produce una tinción de las células apoptóticas y permite diferenciarlas del resto.

### 18.1. REACTIVOS

- Medio de inclusión para cortes con criostato *Tissue-Tek* (Sakura)
- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,0:
  - ✓  $NaH_2PO_4$  10 mM
  - ✓  $KH_2PO_4$  1,76 mM
  - ✓ NaCl 150 mM
  - ✓ KCl 2,7 mM
- Portaobjetos tratados con poli-lisina *Poly-Prep Slides* (Sigma)
- Kit *DeadEnd<sup>TM</sup> Colorimetric TUNEL system* (Promega):
  - ✓ Tampón de equilibrado
  - ✓ Mezcla de nucleótidos biotinilados
  - ✓ TdT recombinante
  - ✓ SSC 20X
  - ✓ Proteinasa K
  - ✓ Estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Estreptavidina-HRP)
  - ✓ DAB 20X
  - ✓ Tampón DAB 20X
  - ✓  $H_2O_2$  20X
  - ✓ Cubreobjetos de plástico
- Tampón de digestión:
  - ✓ Tris-HCl 100 mM, pH 8,0
  - ✓ EDTA 50 mM
- Agua estéril
- Formol tamponado (10% Formaldehído en PBS)
- $H_2O_2$  0,3%
- Hematoxilina de Harris



- Alcohol-ácido (1% HCl en Etanol de 70°)
- Etanol de 96° y absoluto
- Xileno
- Medio de montaje (DePeX)

## 18.2. MÉTODO

Se extrae el cerebro de las ratas conforme se ha descrito en la [sección 3.2](#). Se realiza un corte a nivel del quiasma óptico e, inmediatamente, se ultracongela a -80°C la sección posterior del cerebro, donde se encuentra el hipocampo. A continuación, se incluyen las secciones en medio de inclusión *Tissue-Tek* (Sakura) y se realizan cortes de 10 µm con un criostato (Leika CM-1850). Los cortes se montan sobre portaobjetos tratados con poli-lisina (*Poly-Prep*, Sigma) y se conservan a -80°.

El ensayo comienza sumergiendo los portaobjetos con los cortes de hipocampo en formol tamponado, durante 15 minutos, para fijar el tejido. A continuación, se lavan los portaobjetos 2 veces con PBS durante 5 minutos y se cubren con proteinasa K 20 µg/ml en tampón de digestión, incubándose a temperatura ambiente durante 10 minutos para permeabilizar el tejido. La reacción se finaliza lavando los portaobjetos dos veces con PBS durante 5 minutos. Se fijan de nuevo los tejidos con formol tamponado durante 5 minutos y se lavan dos veces con PBS durante 5 minutos para eliminar los restos del fijador. Se preincuban los portaobjetos con tampón de equilibrado durante 10 minutos y, mientras tanto, se prepara la mezcla de reacción, que contiene, por cada 100 µl, 1 µl de TdT, 1 µl de la mezcla de nucleótidos biotinilados y 98 µl de tampón de equilibrado. De forma paralela, se prepara la mezcla de reacción para el control negativo, que contiene agua estéril en lugar de TdT. Transcurrido el tiempo de preincubación se añaden 100 µl de la mezcla de reacción o de la mezcla de reacción para el control negativo a cada portaobjetos y se cubren cuidadosamente con los cubreobjetos de plástico que incluye el kit para facilitar que el reactivo se distribuya de manera uniforme y minimizar las pérdidas por evaporación. Se incuban los portaobjetos durante 1 hora a 37°C en una cámara humidificada y, transcurrido ese tiempo, se retiran los cubreobjetos y se termina la reacción sumergiendo los cortes en SSC 2X durante 15 minutos. Los portaobjetos se lavan 3 veces con PBS durante 5 minutos y se sumergen en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% durante 5 minutos para bloquear las peroxidasas endógenas. A continuación, se añaden 100 µl de estreptavidina-HRP (1:500 en PBS) a cada portaobjetos,



se tapan con nuevos cubreobjetos de plástico y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavan los portaobjetos 3 veces con PBS durante 5 minutos para eliminar los restos de estreptavidina-HRP y se añaden, a cada uno, 100  $\mu$ l de una mezcla cromógena que contiene DAB 1X, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1X y Tampón DAB 1X disueltos en agua estéril. La reacción se mantiene hasta que los cortes se tornan de un color marrón claro y se lavan varias veces con agua destilada hasta eliminar los restos de cromógeno.

Para contrastar los cortes, se sumergen los portaobjetos en Hematoxilina de Harris durante 5 minutos y se lavan con agua destilada hasta que se eliminan los restos de colorante. A continuación, se sumergen dos o tres veces en alcohol ácido para diferenciar y se aclaran con abundante agua destilada. Se procede a deshidratar los cortes sumergiéndolos primero en etanol de 96° durante 10 minutos y, a continuación, en etanol absoluto otros 10 minutos. Por último, se sumergen los portaobjetos en xileno durante 10 minutos, se montan con DePeX y se observan al microscopio óptico. Los núcleos de las células normales aparecen teñidos de color morado mientras que los de las células apoptóticas aparecen de color marrón oscuro.

## Resultados

“Εύρηκα (Eureka)”.  
[Arquímedes]

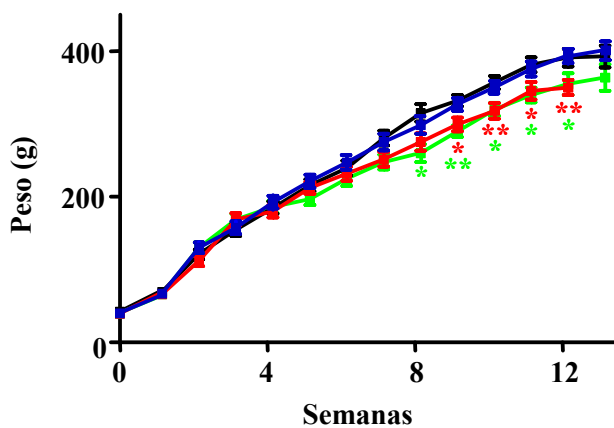


## A. VITAMINA A

En este primer bloque de resultados, se exponen los efectos de la deficiencia de VA y/o el tratamiento con TTR sobre distintos componentes de la vía de señalización de la SST, los sistemas de defensa antioxidantes y la supervivencia celular en el hipocampo de ratas Sprague-Dawley machos, así como los signos clínicos de dicha deficiencia vitamínica.

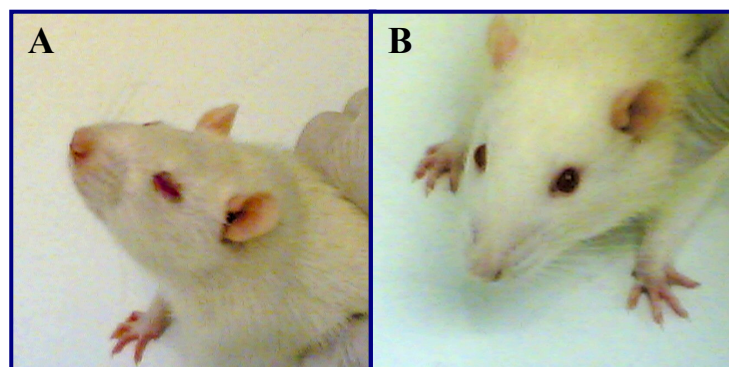
### A.1. SIGNOS CLÍNICOS

Se inició el presente estudio con la valoración de los signos clínicos producidos en las ratas por una deficiencia de VA. Para ello, se determinó, en primer lugar, los efectos de dicha deficiencia sobre el peso corporal de las ratas. Tras 12 semanas de ser alimentadas con un pienso deficitario en VA, las ratas mostraron una disminución significativa en el peso corporal con respecto a las ratas alimentadas con un pienso estándar (Figura 39). Además, estas ratas presentaron síntomas de conjuntivitis y xeroftalmia (Figura 40), que remitieron tras ser tratadas con inyecciones intraperitoneales (i.p.) de TTR (150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso) durante una semana. Las ratas control tratadas con TTR no mostraron cambios significativos en su peso con respecto al grupo control.



**Figura 39:** Evolución del peso de las ratas control (■), ratas tratadas con TTR (■), ratas alimentadas con un pienso sin VA (■) y ratas alimentadas con un pienso sin VA y tratadas posteriormente con TTR (■). Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de cinco ratas. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

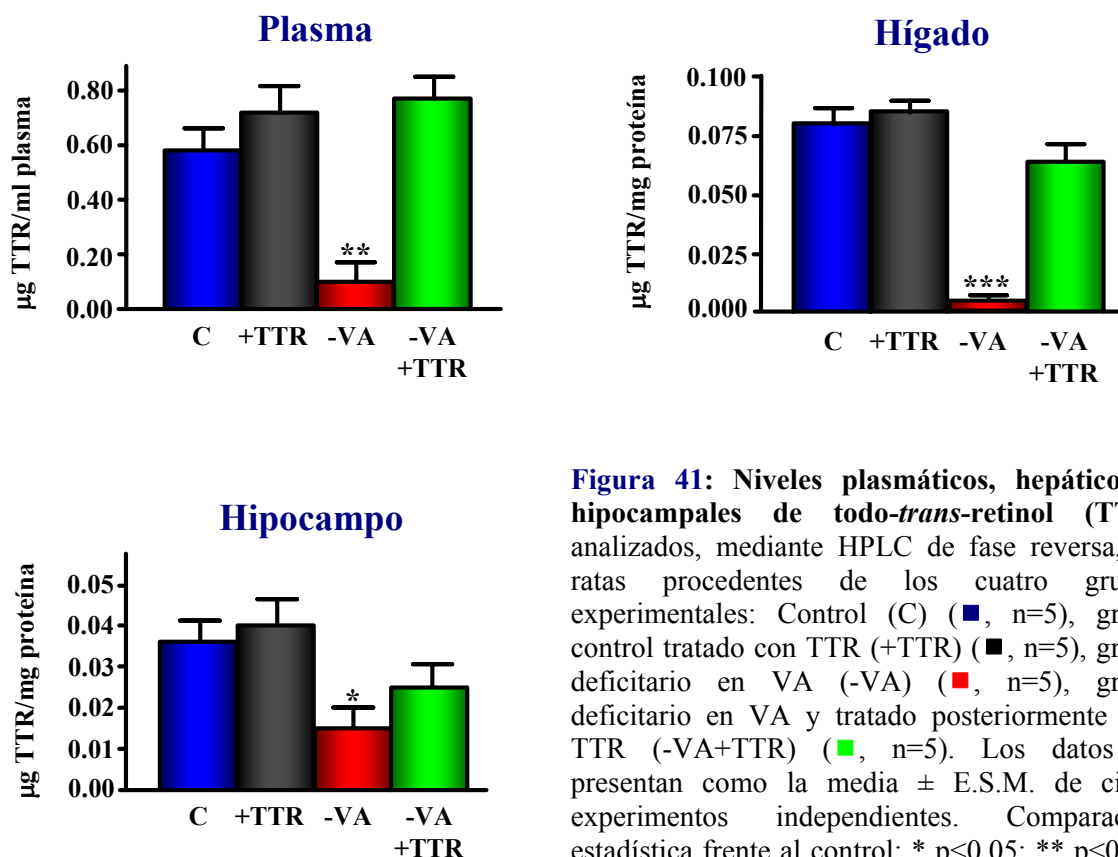
**Figura 40. Panel A:** Detalle de una rata con deficiencia de vitamina A. Puede observarse como el ojo presenta conjuntivitis. **Panel B:** La misma rata tras una semana de tratamiento con 150  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  de todo-*trans*-retinol. Los ojos y los párpados presentan un aspecto normal.





## A.2. NIVELES DE VITAMINA A EN PLASMA, HIGADO E HIPOCAMPO

Como control del modelo de deficiencia y/o tratamiento de VA, se analizaron los niveles de todo-*trans*-retinol (TTR) en el hipocampo y en plasma de las ratas después de cada inducción. Además, dado que la VA se almacena en el hígado en forma de ésteres de retinol (principalmente palmitato de retinol), también se analizaron los niveles de TTR en este órgano. Tras 12 semanas de deficiencia de VA, se encontró una reducción significativa en los niveles de TTR en las tres muestras estudiadas en comparación con los valores control (Figura 41). Cuando las ratas deficitarias en VA se trataron durante una semana con inyecciones de TTR por vía i.p., los niveles de TTR retornaron a los valores control (Figura 41). Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores (Oliveros y col., 2000; Cocco y col, 2002).



**Figura 41:** Niveles plasmáticos, hepáticos e hipocámpales de todo-*trans*-retinol (TTR) analizados, mediante HPLC de fase reversa, en ratas procedentes de los cuatro grupos experimentales: Control (C) (■, n=5), grupo control tratado con TTR (+TTR) (■, n=5), grupo deficitario en VA (-VA) (■, n=5), grupo deficitario en VA y tratado posteriormente con TTR (-VA+TTR) (■, n=5). Los datos se presentan como la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



### A.3. EFECTOS DE LA VITAMINA A SOBRE EL SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO

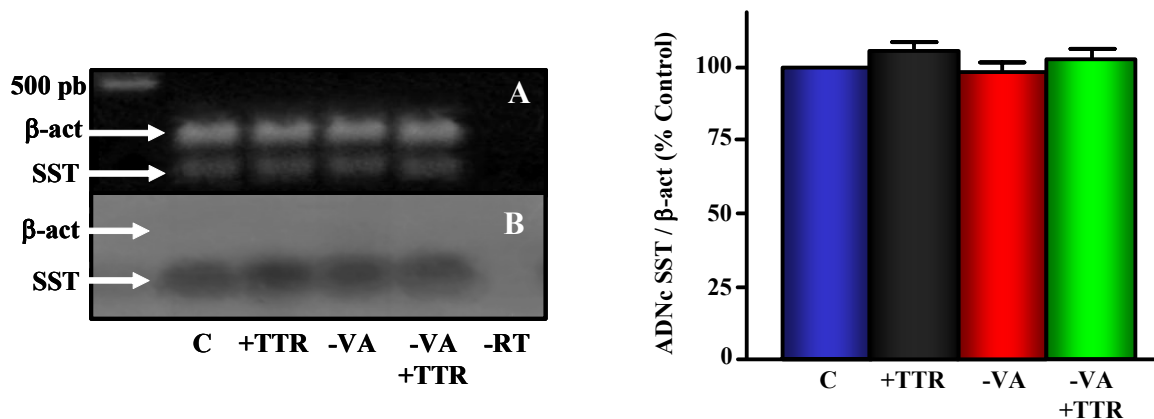
#### A.3.1. Expresión del gen de la somatostatina

Una vez comprobados los signos clínicos provocados por la deficiencia de VA, decidimos averiguar si dicha deficiencia podría alterar la vía de señalización de la SST. Para ello, se analizó, en primer lugar, la expresión de la SST en el hipocampo de la rata en condiciones de deficiencia de VA o tras el tratamiento con TTR.

La alimentación de las ratas con un pienso sin VA durante 12 semanas indujo una disminución muy significativa en los niveles hipocampales de SST inmunorreactiva (SST-IR) en comparación con el grupo control (Tabla 18). La deficiencia de VA, sin embargo, no modificó los niveles de ARNm de la SST, como muestra la Figura 42. Tras una semana de tratamiento de estas ratas con TTR, los niveles de SST-IR revirtieron a los valores control mientras que este tratamiento no provocó cambios significativos en dichos parámetros en las ratas control.

Grupos	SST-IR (ng/mg proteína)
Control	10,8 ± 1,1
+TTR	9,8 ± 0,6
-VA	<b>1,9 ± 0,5**</b>
-VA+TTR	8,5 ± 2,1

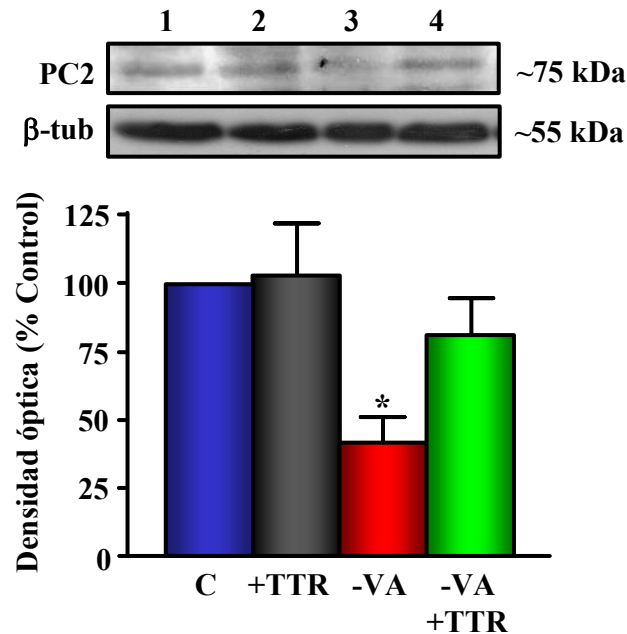
**Tabla 18:** Concentración de somatostatina inmunorreactiva (SST-IR), determinada mediante radioinmunoanálisis (RIA), en el hipocampo de ratas procedentes de los cuatro grupos experimentales. Control: ratas alimentadas con un pienso estándar durante 12 semanas y tratadas con vehículo durante 1 semana; +TTR: ratas control tratadas con TTR (150 µg/kg/día) durante 1 semana; -VA: ratas alimentadas durante 12 semanas con un pienso sin vitamina A; -VA+TTR: ratas alimentadas durante 12 semanas con un pienso sin VA y tratadas posteriormente durante una semana con TTR (150 µg/kg/día). Los datos se presentan como la media ± E.S.M. de cinco experimentos independientes realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: \*\* p<0,01.



**Figura 42. Panel izquierdo: Detección del ARNm de la somatostatina (SST) mediante RT-PCR (A) y Southern-blot (B) en el hipocampo de ratas procedentes de los cuatro grupos experimentales. C: ratas control; +TTR: ratas tratadas con TTR; -VA: ratas alimentadas con un pienso sin VA; -VA+TTR: ratas alimentadas con un pienso sin VA y tratadas posteriormente con TTR. El ARN total aislado y purificado fue sometido a una reacción de retrotranscripción y, a continuación, a 30 ciclos de amplificación con cebadores específicos para la SST y la  $\beta$ -actina ( $\beta$ -act). El producto de la reacción se corrió en un gel de agarosa, se tiñó con bromuro de etidio y, posteriormente, fue hibridado con una sonda específica para la SST marcada con  $^{32}\text{P}$  y autorradiografiada a  $-70^\circ\text{C}$ . Como control de contaminación, se realizó un control negativo (-RT) que no contenía muestra. **Panel derecho: Análisis densitométrico de las bandas específicas de la SST** obtenidas por Southern-blot. Los valores se normalizaron con respecto a la intensidad de la banda de la  $\beta$ -actina y se representan como un porcentaje del valor del grupo control, a cuya densidad óptica se le dio un valor de 100%. Los valores se presentan como la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos diferentes.**

### A.3.2. Expresión de la prohormona convertasa 2

El siguiente objetivo fue analizar a qué se podía atribuir la falta de correlación entre los niveles de SST-IR y los niveles del ARNm de la SST en el grupo de ratas alimentadas con un pienso sin VA. Dado que la SST se sintetiza como una prepro-hormona inmadura (prepro-SST) que, posteriormente, es escindida por la enzima PC2 para dar lugar al péptido maduro (Patel y Galanopoulou, 1995; Winsky-Sommerer y col., 2003), se estudiaron los niveles de dicha enzima en el hipocampo de estas ratas mediante inmunoblot. Como se observa en la [Figura 43](#), la deficiencia de VA indujo una disminución significativa de los niveles proteicos de PC2 en el hipocampo de las ratas, lo que podría conducir a un menor procesamiento del precursor de la SST. Este efecto revirtió al valor control tras una semana de tratamiento con TTR. No se observaron cambios significativos en el grupo control tratado con TTR.



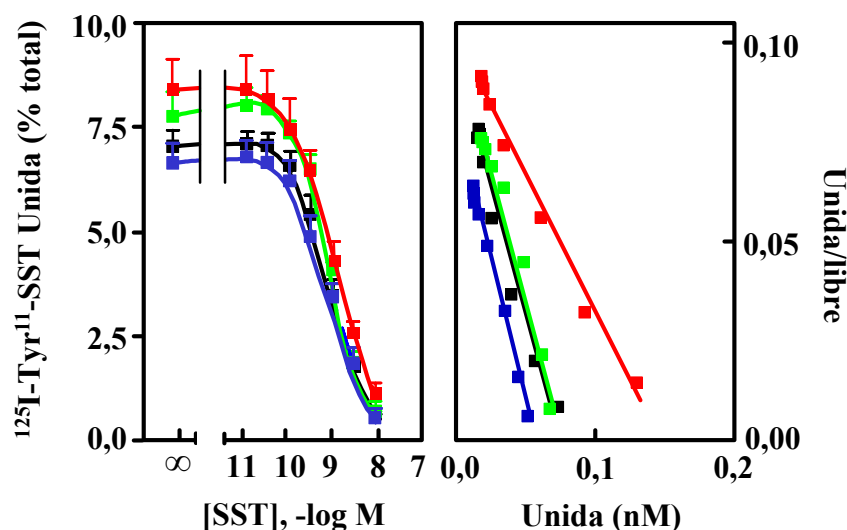
**Figura 43. Panel Superior:** Autorradiografía derivada de la inmunodetección de la prohormona convertasa 2 (PC2) en el hipocampo de ratas procedentes de los cuatro grupos experimentales. El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas durante una semana con TTR (n=5), el carril 3 a ratas alimentadas con un pienso sin VA (n=5) y el carril 4 a ratas alimentadas con un pienso sin VA y tratadas posteriormente con TTR (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Como control de carga, se empleó β-tubulina (β-tub). Las autorradiografías mostradas son representativas de cinco ensayos realizados. **Panel Inferior:** Análisis densitométrico de los niveles de PC2 en el hipocampo de ratas control (C), ratas tratadas con TTR (+TTR), ratas deficitarias en VA (-VA) y ratas deficitarias en VA tratadas con TTR (-VA+TTR). Las densidades ópticas se normalizaron con las correspondientes a la β-tub y se presentan como porcentajes del control, a cuya densidad, una vez normalizada, se le asignó un valor arbitrario de 100%. Los datos representan la media ± E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \* p<0,05.

### A.3.3. Receptores de somatostatina

#### **A.3.3.1. Parámetros de unión de la somatostatina a sus receptores**

A la vista de los resultados anteriores, se procedió, a continuación, a analizar los parámetros de unión de la SST a sus receptores específicos de membrana, que median las acciones del péptido. El análisis de dicha unión se realiza en membranas mediante estudios de competición, donde la  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST-14}$  se desplaza con concentraciones crecientes de SST fría. Estudios preliminares con membranas procedentes del hipocampo revelaron que estos receptores unen la  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST-14}$  de forma dependiente del tiempo, alcanzándose un equilibrio aparente a los 60 minutos, a 30°C, que permanece estable durante al menos 120 minutos. Por ello, los ensayos de unión competitiva se realizaron bajo estas condiciones

experimentales. Las membranas procedentes del hipocampo presentaron niveles similares de degradación de la SST, no variando más de un 10% entre los distintos grupos experimentales. No obstante, en las membranas de ratas procedentes del grupo deficitario en VA, se observó un aumento significativo en la unión específica del trazador a los SSTR con respecto al grupo control, tanto en ausencia como en presencia de SST (Figura 44, panel izquierdo). El análisis de Scatchard demuestra que este aumento se debe a un incremento en el número de dichos receptores (Figura 44, panel derecho; Tabla 19). Asimismo, se observa una mayor constante de disociación (Kd) en el grupo de ratas con deficiencia de VA. El tratamiento de estas ratas con TTR durante una semana (150  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) revirtió estas alteraciones a los valores control, mientras que este mismo tratamiento no alteró dichos parámetros en las ratas control (Figura 44, Tabla 19).



**Figura 44.** Efectos de la vitamina A (VA) sobre la unión de la somatostatina (SST) a sus receptores. **Panel izquierdo:** Inhibición competitiva de la unión de la  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST-14}$  a membranas de hipocampo de rata por SST fría. Las membranas se incubaron durante 60 minutos a  $30^\circ\text{C}$  en presencia de  $250 \text{ pM}$  de  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST-14}$  y concentraciones crecientes del péptido nativo. Los puntos corresponden a ratas control (■,  $n=5$ ), ratas control tratadas con TTR (■,  $n=5$ ), ratas deficitarias en VA (■,  $n=5$ ) y ratas deficitarias en VA tratadas posteriormente con TTR (■,  $n=5$ ). Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. **Panel derecho:** Análisis de Scatchard de los datos de unión. Los correspondientes parámetros de equilibrio se muestran en la Tabla 19.

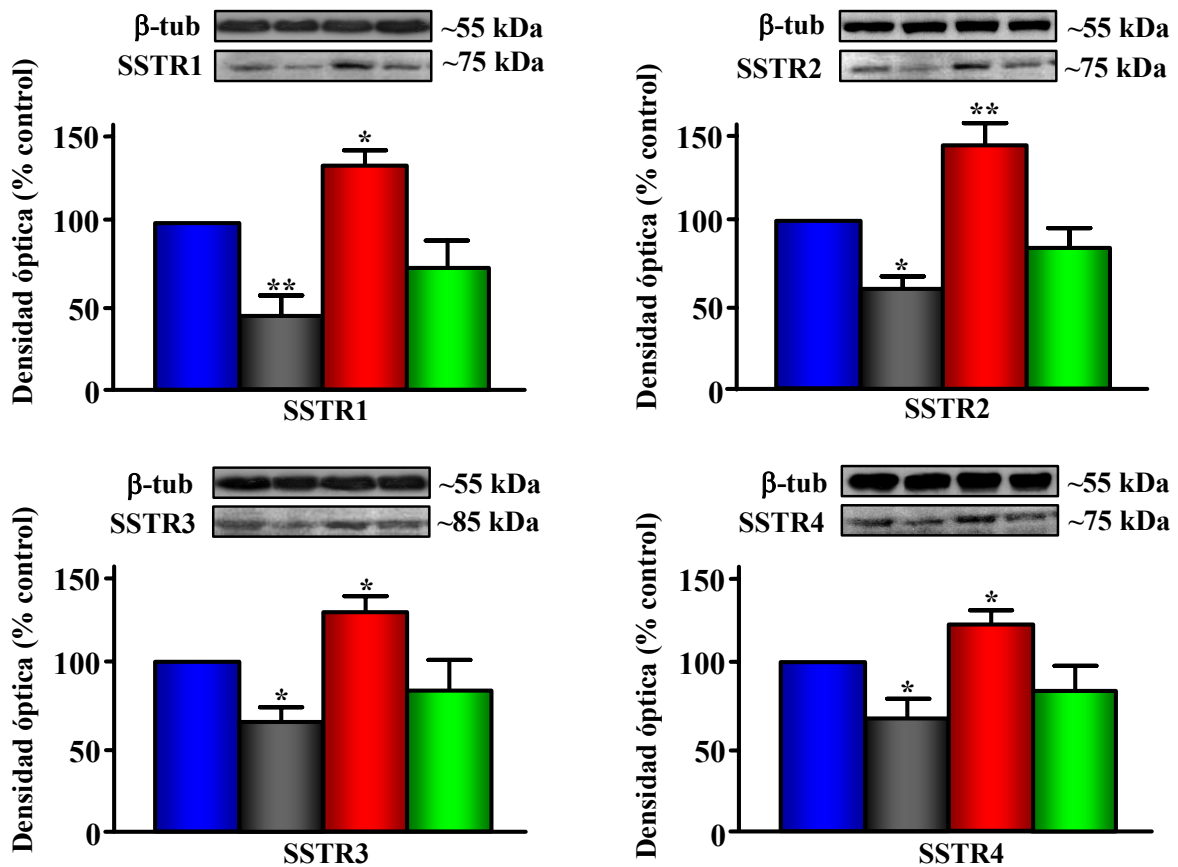


Grupos	Receptores de SST	
	Bmax	Kd
Control	445,6 ± 63,2	0,61 ± 0,12
+TTR	487,7 ± 19,1	0,66 ± 0,10
-VA	<b>979,6 ± 59,4**</b>	<b>1,23 ± 0,18*</b>
-VA+TTR	514,7 ± 19,1	0,56 ± 0,05

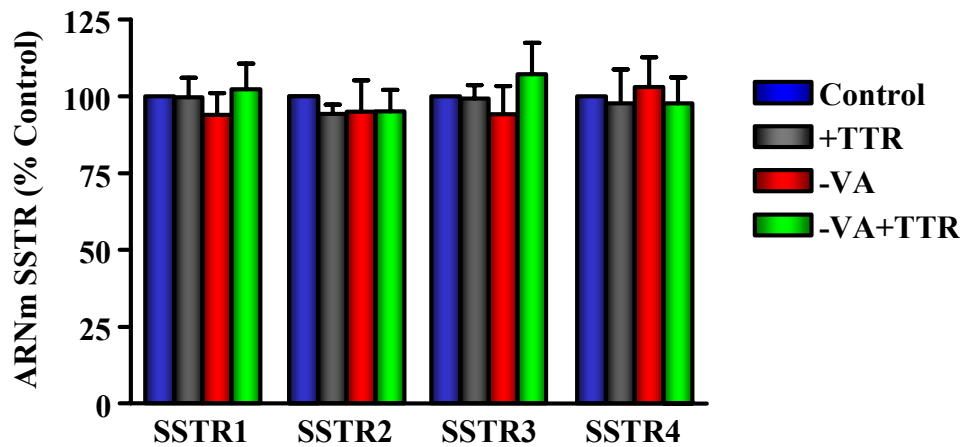
**Tabla 19:** Efecto de la VA sobre los parámetros de equilibrio de la unión de la somatostatina (SST) a sus receptores en membranas de hipocampo de ratas control, ratas tratadas con TTR (+TTR), ratas deficitarias en VA (-VA) y ratas deficitarias en VA tratadas posteriormente con TTR (-VA+TTR). Los parámetros de equilibrio se calcularon a partir del análisis de Scatchard por regresión lineal. Las unidades para la Kd son nM y para la Bmax femtomoles de SST unida por mg de proteína. Los valores se expresan como la media ± E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control \* p<0,05; \*\* p<0,01.

### A.3.3.2. Expresión de los receptores de somatostatina

Diversos autores han puesto de manifiesto, mediante técnicas de clonación, la existencia de cinco subtipos de SSTR (SSTR1-SSTR5) en membranas de células animales (Bruno y col., 1992; Yamada y col., 1992; O'Carroll y col., 1992). En vista de los cambios en los parámetros de unión de la SST a sus receptores observados en el grupo de ratas deficitarias en VA y dado que el análogo de SST utilizado en los ensayos presenta una afinidad similar por los cinco subtipos de receptores, resultó de interés comprobar si la deficiencia de VA modifica la expresión de alguno de los subtipos expresados en el hipocampo (SSTR1-SSTR4). Para ello, se analizó primero, mediante inmunoblot con anticuerpos específicos, los niveles proteicos de los cuatro subtipos de SSTR expresados en membranas de hipocampo y, posteriormente, los niveles del ARNm correspondiente, mediante PCR a tiempo real. La [Figura 45](#) muestra que la deficiencia de VA induce un aumento significativo en los niveles proteicos de SSTR1-SSTR4. Sin embargo, no se encontraron cambios significativos en los niveles de ARNm de dichos receptores ([Figura 46](#)). Por otro lado, el tratamiento de las ratas alimentadas con un pienso sin VA con TTR durante una semana revirtió los niveles proteicos de los subtipos SSTR1, SSTR3 y SSTR4 a los valores control. Sorprendentemente, este mismo tratamiento provocó un aumento significativo en los niveles proteicos del subtipo SSTR2, tanto en ratas control como en ratas deficitarias en VA ([Figura 45](#)).



**Figura 45:** Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de los receptores de somatostatina presentes en el hipocampo (SSTR1-4) de ratas control (■, n=5), ratas tratadas con TTR (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VA (■, n=5) y ratas alimentadas con un pienso sin VA y tratadas posteriormente con TTR (■, n=5). Como control de carga, se utilizó  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub), detectada con un anticuerpo monoclonal. Las densidades ópticas se presentan como porcentajes del control, a cuya densidad, una vez normalizada con la  $\beta$ -tub, se le asignó un valor arbitrario de 100%. Los datos representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



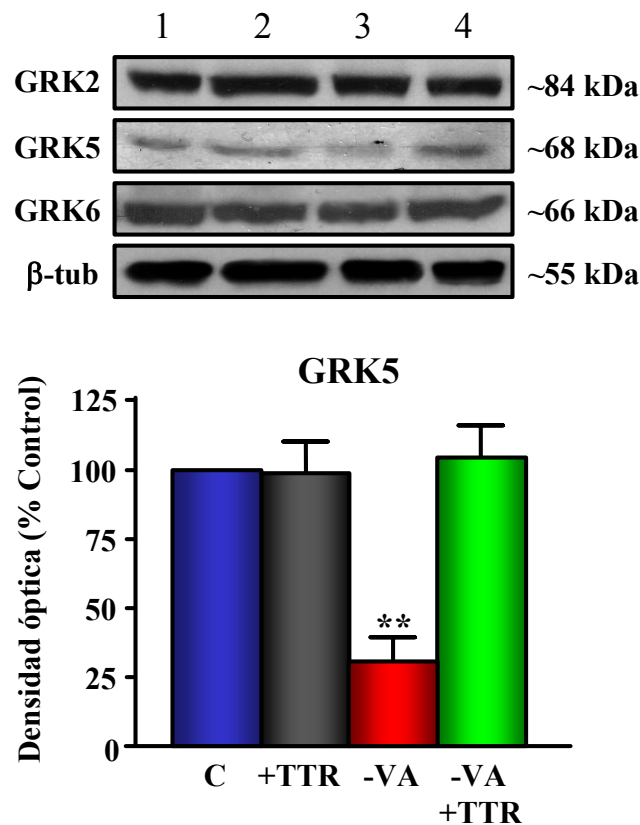
**Figura 46:** Ratio relativa de ARNm de los distintos subtipos de receptores de somatostatina (SSTR) determinado mediante PCR a tiempo real en hipocampo de ratas control, ratas tratadas con TTR (+TTR), ratas alimentadas con un pienso sin VA (-VA) y ratas alimentadas con un pienso sin VA y tratadas posteriormente con TTR (-VA+TTR). El ARNm aislado del hipocampo de las ratas se sometió a una reacción de transcripción inversa y, posteriormente, fue amplificado mediante PCR a tiempo real con cebadores específicos para los subtipos de SSTR y para  $\beta$ -actina, usada como gen control. La cantidad de ARNm inicial se calculó aplicando la ecuación de Pfaffl y se expresó en % del grupo control, al que se le dio un valor arbitrario de 100%. Los datos expresan la media  $\pm$  E.S.M de cinco experimentos diferentes, realizado cada uno por triplicado. No se observaron diferencias significativas en los ARNm entre los distintos grupos experimentales.

#### A.3.4. Expresión de las quinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRK)

Una vez valorada la expresión de los SSTR, nos planteamos profundizar en el mecanismo molecular implicado en el aumento de los niveles proteicos de SSTR1-SSTR4 detectado en las ratas deficitarias en VA. Se sabe que, estructuralmente, los SSTR pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), que son desensibilizados por la familia de las GRK. Por consiguiente, se planteó la hipótesis de que una reducción en la expresión de alguna de estas GRK podría conducir a una disminución en la fosforilación de los SSTR y, por tanto, a una disminución en su internación. Para evaluar dicha hipótesis, se midieron los niveles proteicos de GRK2, GRK5 y GRK6 presentes en membranas de hipocampo de rata, dada a la elevada expresión de las tres isoformas en el SNC (Gainetdinov y col., 2004). Como se puede ver en la Figura 47, la deficiencia de VA indujo una reducción significativa en la inmunodensidad de GRK5, sin cambios significativos en GRK2 o GRK6. El tratamiento de estas ratas con TTR durante una semana revirtió este parámetro al valor



control. En ratas controles tratadas con TTR no se observó ningún cambio significativo en ninguna de las tres GRK analizadas.



**Figura 47. Panel superior:** Autorradiografías derivadas de los inmunoblots de los subtipos 2, 5 y 6 de las quinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRK2, GRK5 y GRK6) en hipocampo de rata. El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con TTR (n=5), el carril 3 a ratas alimentadas con un pienso sin VA (n=5) y el carril 4 a ratas alimentadas con un pienso sin VA y posteriormente tratadas con TTR (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Como control de carga, se realizó la inmunodetección de  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub) con un anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -tub. **Panel Inferior:** Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de GRK5 presente en el hipocampo de ratas control (C, ■), ratas tratadas con TTR (+TTR, ■), ratas alimentadas con un pienso deficitario en VA (-VA, ■) y ratas deficitarias en VA y posteriormente tratadas con TTR (-VA+TTR, ■). Las densidades ópticas se presentan como porcentajes del control, a cuya densidad se le asignó un valor arbitrario de 100%. Los datos representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*\*  $p < 0,01$ .

### A.3.5. Efectos de la vitamina A sobre la vía de la adenilato ciclasa

#### **A.3.5.1. Actividad adenilato ciclasa**

Como se ha descrito previamente en la [Introducción](#), la enzima AC es uno de los principales efectores acoplados, vía proteínas  $G_i$ , a los SSTR. Por ello, el siguiente paso fue estudiar si la deficiencia de VA y/o el tratamiento con TTR alteran la actividad de dicha



enzima en condiciones basales o estimuladas por forskolina (FK), así como la capacidad de la SST de inhibir dichas actividades. Se observó una disminución significativa tanto en la actividad AC basal como en la actividad AC estimulada por FK en el grupo de ratas deficitarias en VA en comparación con el grupo control. Además, la capacidad de la SST para inhibir la actividad AC fue significativamente menor en este grupo experimental (Tabla 20). El tratamiento de las ratas deficitarias en VA con TTR durante una semana reestableció la actividad AC a su valor control, mientras que la administración de TTR a ratas control no alteró dicho parámetro. Las veces de estimulación de la actividad AC por FK fueron similares entre los distintos grupos experimentales analizados.

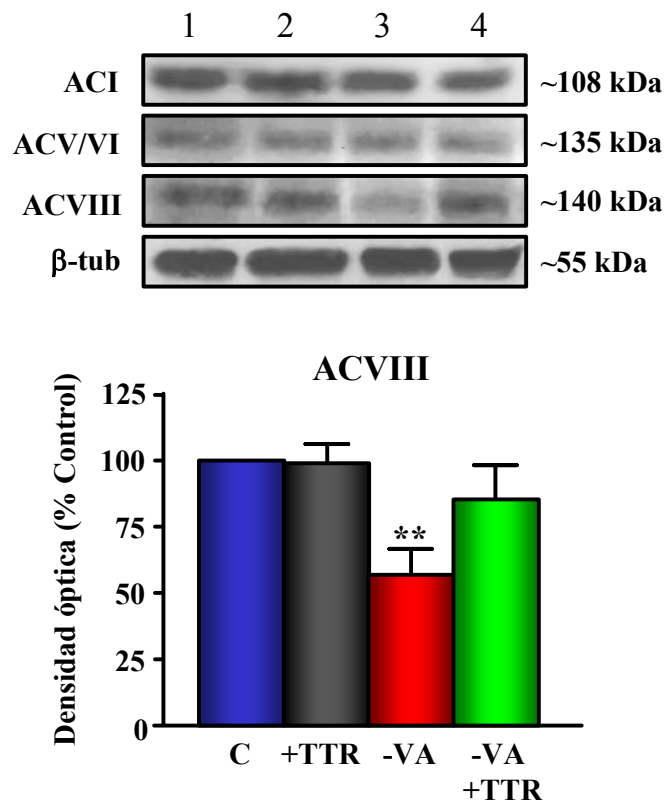
Actividad adenilato ciclasa (pmol AMPc/min/mg de proteína)				
	Control	+ TTR	-VA	-VA+TTR
<b>Actividad Basal</b>	512,1±49,4	480,3±54,8	<b>321,5±65,8*</b>	447,9±144,9
<b>+10<sup>-4</sup> M SST</b>	329,7±91,5	318,9±83,6	269,0±97,7	240,0±78,7
<b>+10<sup>-5</sup> M FK</b>	1135,0±115,5	1174,2±93,5	<b>796,8±79,7*</b>	1027,5±117,8
<b>+10<sup>-5</sup> M FK +10<sup>-4</sup> M SST</b>	642,5±160,2	638,6±113,9	642,9±105,1	462,5±161,1
<b>Veces de estimulación por FK</b>	2,2±0,1	2,4±1,4	2,5±1,1	2,3±0,9
<b>% Inhibición por SST de la actividad basal</b>	36,1±14,4	34,5±7,3	<b>15,8±7,1*</b>	50,5±7,9
<b>% Inhibición por SST de la actividad estimulada por FK</b>	42,6±9,4	37,1±8,1	<b>19,1±4,0*</b>	48,5±9,7

**Tabla 20:** Efecto de la somatostatina (SST, 10<sup>-4</sup> M) y de la forskolina (FK, 10<sup>-5</sup> M) sobre la actividad adenilato ciclasa en membranas de hipocampo de ratas control (n=5), ratas tratadas con TTR (+TTR, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VA (-VA, n=5) y ratas alimentadas con un pienso sin VA y tratadas posteriormente con TTR (-VA+TTR, n=5). Los valores representan la media ± E.S.M. de cinco experimentos individuales realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: \* p<0,05.

#### A.3.5.2. Expresión de la adenilato ciclasa

A la vista de los resultados anteriores, se planteó la hipótesis de que la reducción en la actividad AC detectada en el grupo de ratas deficitarias en VA podría ser reflejo de una menor expresión de alguna isoforma de la enzima. Para evaluar esta hipótesis, se analizaron los niveles proteicos de ACV/VI, al ser dos isoformas que se inhiben por proteínas G $\alpha$ i (Sunahara y Taussig, 2002), y de ACI y ACVIII, ya que son las isoformas que se expresan mayoritariamente en el cerebro (Sunahara y Taussig, 2002). Como puede apreciarse en la

Figura 48, la deficiencia de VA provocó una disminución significativa en la expresión de la ACVIII, sin cambios significativos en las otras isoformas. Tras una semana de tratamiento con TTR, los niveles proteicos de ACVIII en membranas de hipocampo de ratas alimentadas sin VA retornó al valor control; el mismo tratamiento en ratas control no modificó dicho parámetro.

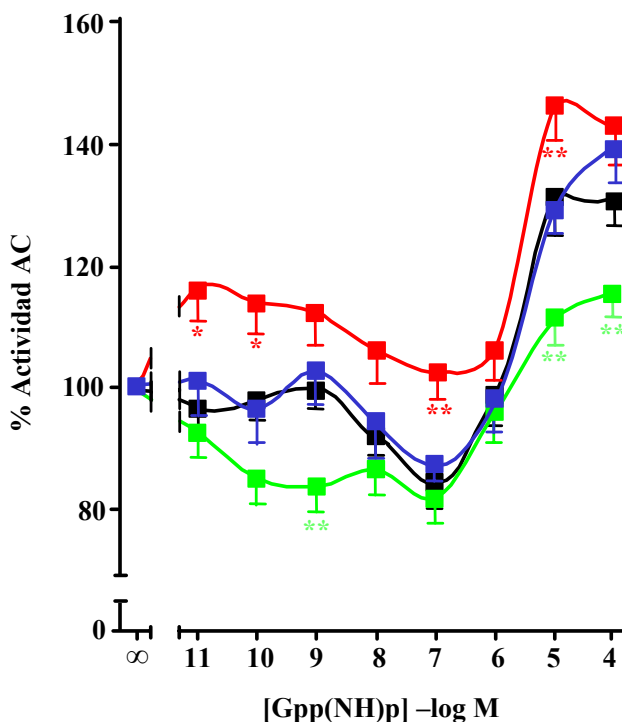


**Figura 48. Panel superior:** Autorradiografías derivadas de los inmunoblots de los subtipos I, V/VI y VIII de la enzima adenilato ciclasa (AC) en membranas de hipocampo de rata. El carril 1 corresponde a ratas control, el carril 2 a ratas tratadas con TTR, el carril 3 a ratas alimentadas con un pienso sin VA y el carril 4 a ratas alimentadas con un pienso sin VA y tratadas posteriormente con TTR. Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Se utilizó la inmunodetección de  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub) como control de carga. **Panel inferior:** Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de ACVIII presente en membranas de hipocampo de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con TTR (+TTR) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VA (-VA) (■, n=5) y ratas deficitarias en VA y tratadas posteriormente con TTR (-VA+TTR) (■, n=5). Las densidades ópticas se normalizaron con  $\beta$ -tub y los valores se presentan como porcentajes del control, a cuya densidad se le asignó un valor arbitrario de 100%. Los datos representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*\*  $p < 0,01$ .



### A.3.5.3. Funcionalidad y expresión de las proteínas Gi

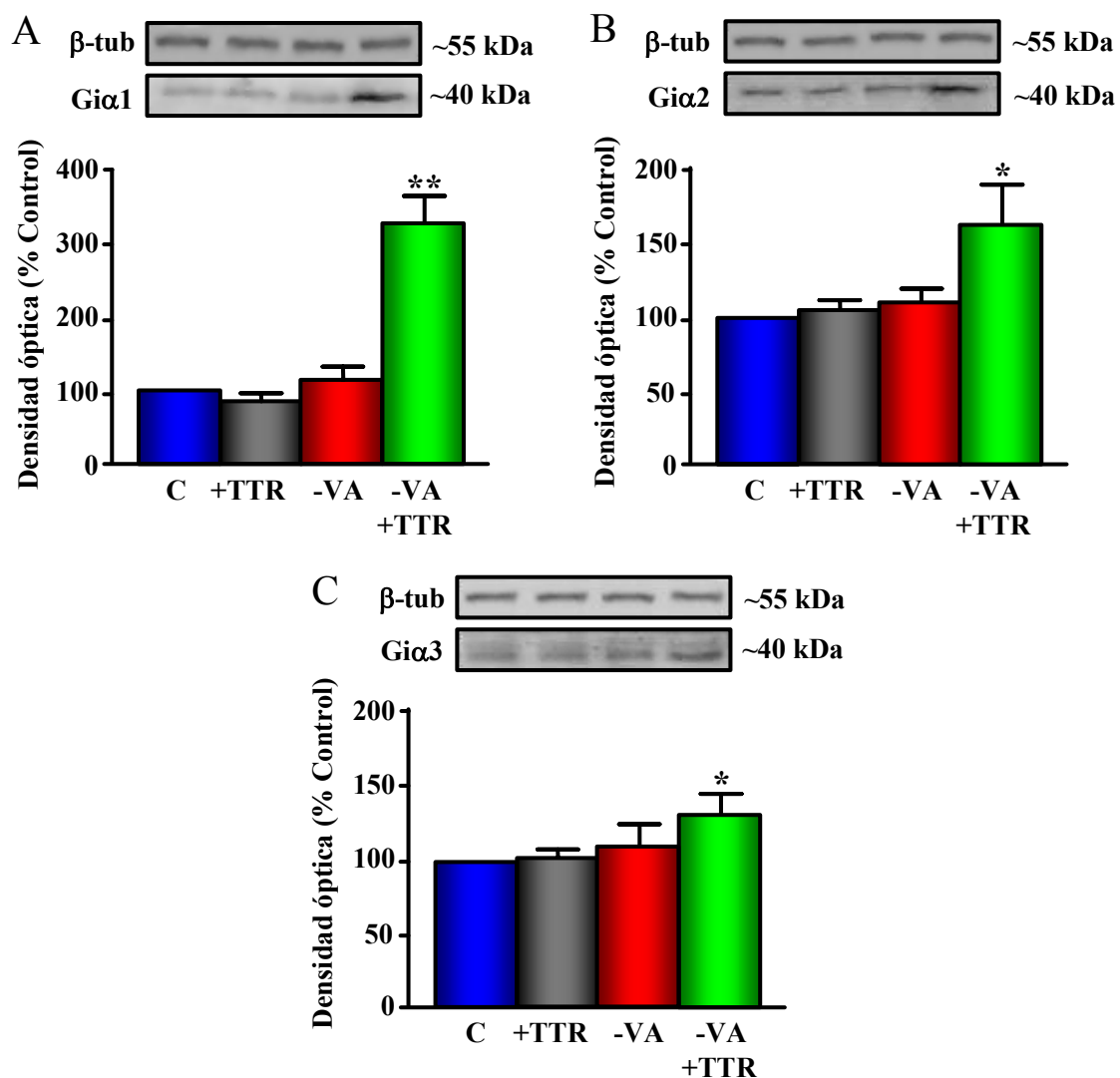
Por otro lado, tal y como se ha descrito en apartados anteriores, se sabe que la inhibición de la AC por la SST se produce a través de las subunidades  $\alpha_i$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  o  $\alpha_3$ ) de las proteínas Gi. Dada la disminución en la capacidad de la SST para inhibir la AC en el grupo deficitario en VA, pese al aumento significativo del número de receptores de SST, se midió la actividad de las proteínas Gi y los niveles proteicos de las subunidades  $\alpha_i$  para comprobar si existen alteraciones a este nivel en dicho grupo experimental. Se analizó, en primer lugar, la actividad funcional de las proteínas Gi. Para ello, se incubaron membranas de hipocampo en presencia de FK ( $3 \times 10^{-6}$  M), que estimula la actividad AC, y concentraciones crecientes de un análogo no hidrolizable de GTP, el 5'-guanilimidodifosfato (Gpp(NH)p). Como muestra la **Figura 49**, las concentraciones crecientes de Gpp(NH)p generan una curva bifásica, con una disminución de la actividad AC en el rango de  $10^{-11}$ - $10^{-7}$  M, como consecuencia de una activación de las proteínas Gi y un aumento de dicha actividad a concentraciones mayores, por activación de las proteínas Gs. Por consiguiente, este efecto inhibitor del Gpp(NH)p ha sido utilizado por varios autores como medida de la actividad funcional de Gi (Connolly y col., 1991; Young y col., 1991). En ratas control, la máxima inhibición se produce en torno a  $10^{-7}$  M de Gpp(NH)p (**Figura 49**). En el grupo de ratas con deficiencia de VA, el efecto inhibitor del Gpp(NH)p sobre la



**Figura 49:** Curvas dosis-efecto de inhibición de la actividad adenilato ciclasa (AC) mediada por el 5'-guanilimidodifosfato (Gpp(NH)p) en membranas de hipocampo de ratas control (■, n=5), ratas tratadas con TTR (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VA (■, n=5) y ratas alimentadas con un pienso sin VA y tratadas posteriormente con TTR (■, n=5). El efecto del Gpp(NH)p sobre la actividad AC se analizó en presencia de forskolina  $3 \times 10^{-6}$  M y la concentración indicada de Gpp(NH)p. Los datos se expresan como un porcentaje de la actividad AC estimulada por FK en ausencia de Gpp(NH)p (100%) y se presentan como la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos distintos realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

actividad AC fue significativamente menor mientras que el tratamiento de las ratas control con TTR durante una semana no alteró este parámetro. Sin embargo, este mismo tratamiento en ratas alimentadas con un pienso sin VA aumentó significativamente la capacidad inhibitoria del Gpp(NH)p sobre la actividad AC.

A continuación, se procedió a analizar la expresión de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de las proteínas G en membranas de hipocampo de rata mediante inmunoblot. Como se aprecia en la [Figura 50](#), la deficiencia de VA no modificó los niveles proteicos de ninguna de



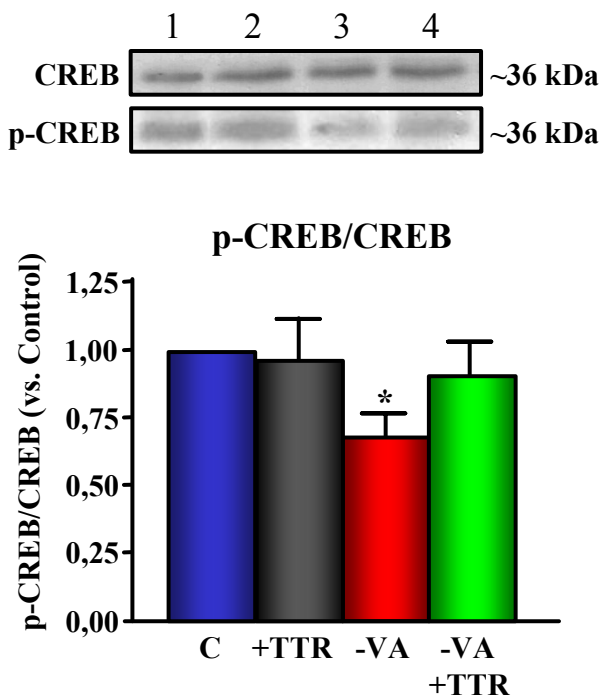
**Figura 50:** Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de **Giα1** (panel A), **Giα2** (panel B) y **Giα3** (panel C) presentes en membranas de hipocampo de ratas control (■, n=5), ratas tratadas con TTR (+TTR) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso deficitario en VA (-VA) (■, n=5) y ratas deficitarias en VA y posteriormente tratadas con TTR (-VA + TTR) (■, n=5). Las densidades ópticas se presentan como porcentajes del control, a cuya densidad se le asignó un valor arbitrario de 100%. Como control de carga se empleó  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub), detectada con un anticuerpo monoclonal. Los datos representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



las subunidades estudiadas. Sin embargo, el tratamiento posterior de las ratas alimentadas sin VA con TTR durante una semana aumentó significativamente los niveles de las tres isoformas. Por otro lado, este mismo tratamiento en ratas control no ejerció ningún efecto sobre la expresión de dichas proteínas.

#### A.4. EFECTOS DE LA VITAMINA A SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE CREB

Está bien establecido que el AMPc activa la PKA que, a su vez, fosforila la proteína CREB en la Ser133 (Priyanka y Medhamurthy, 2007). Los estudios realizados sobre las funciones de CREB han demostrado su implicación en numerosos procesos vitales tales como la proliferación celular (Kinjo y col., 2005), la diferenciación y la supervivencia celular (Saini y col., 2004). Como hemos visto en el apartado A.3.5., la deficiencia de VA conduce a una disminución de la actividad AC y de los niveles de ACVIII en hipocampo de rata. Por consiguiente, el siguiente paso fue analizar los efectos de la deficiencia de VA sobre la fosforilación de CREB. Para ello, medimos los niveles de CREB y CREB fosforilado (p-CREB), mediante inmunoblot, en el hipocampo de la rata. Los resultados demuestran que la deficiencia de VA disminuye la fosforilación de CREB (Figura 51) y que el posterior tratamiento con TTR revierte este parámetro al valor control, no detectándose cambios significativos en el hipocampo de la ratas control tratadas con TTR.

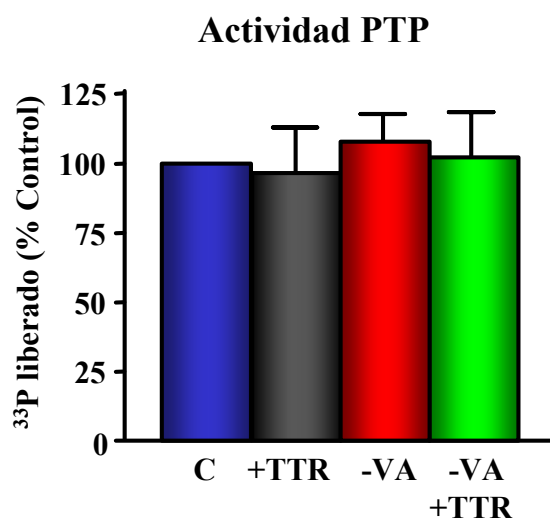


**Figura 51. Panel superior:** Autorradiografías derivadas de los inmunoblots de CREB y p-CREB en hipocampo. El carril 1 corresponde a ratas control, el carril 2 a ratas tratadas con TTR (TTR), el carril 3 a ratas alimentadas con un pienso sin vitamina A (VA) y el carril 4 a ratas alimentadas con un pienso sin VA y tratadas posteriormente con TTR. Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. **Panel inferior:** Relación entre la densidad óptica de las bandas de p-CREB y sus correspondientes bandas de CREB presentes en extracto de hipocampo de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con TTR (+TTR) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VA (-VA) (■, n=5) y ratas deficitarias en VA tratadas con TTR (-VA+TTR) (■, n=5). Los valores se presentan en relación al valor del grupo control, a cuya relación p-CREB/CREB se le asignó un valor arbitrario de 1. Los datos representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ .



### A.5. EFECTOS DE LA VITAMINA A SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOTIROSINA FOSFATASA (PTP)

Varios autores han demostrado que la VA está implicada en la plasticidad neuronal de la formación hipocampal (Chiang y col., 1998; Misner y col., 2001) y se sabe que las PTP son enzimas implicadas en la regulación de la proliferación neuronal (Bernabéu y col., 2006; Horvat y col., 2001). Por ello, valoramos si la deficiencia de VA podría modificar la actividad de estas fosfatasa en el hipocampo. Con este fin, se analizó la actividad PTP en membranas de hipocampo de rata. Para ello, se utilizó un protocolo modificado de Colás y col. (1992). En este método, se valora la capacidad de las PTP para liberar  $^{33}\text{P}$  inorgánico de un polipéptido artificial previamente fosforilado. Como puede verse en la [Figura 52](#), no se encontraron cambios significativos en este parámetro en ninguno de los grupos experimentales analizados.



**Figura 52: Actividad fosfotirosina fosfatasa (PTP) en membranas de hipocampo de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con *trans*-retinol (+TTR) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso deficitario en vitamina A (-VA) (■, n=5) y ratas deficitarias en VA tratadas con TTR (-VA+TTR) (■, n=5). Las membranas (0,5 mg/ml) se incubaron con  $^{33}\text{P}$ -poly(Glu:Tyr) 1 $\mu\text{M}$  durante 10 minutos y posteriormente se cuantificó el  $^{33}\text{P}$  liberado. Los datos se presentan como porcentaje del grupo control, a cuya cantidad de  $^{33}\text{P}$  liberado se le asignó un valor arbitrario de 100%. Los datos representan las media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: no hay diferencias significativas.**

### A.6. EFECTOS DE LA VITAMINA A SOBRE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Como se ha explicado en el apartado 2.2 de la [Introducción](#), el estrés oxidativo puede definirse como un desequilibrio entre los procesos biológicos que conducen a la formación de ERO y aquellos encargados de eliminar estas ERO, también llamados “defensas antioxidantes”. Se ha comprobado que la actividad y expresión de algunas proteínas implicadas en la vía de transducción de señales de la SST pueden alterarse en presencia de ERO y que la VA puede actuar como antioxidante “in vitro” (Chaudiere y col., 1999; Kashif

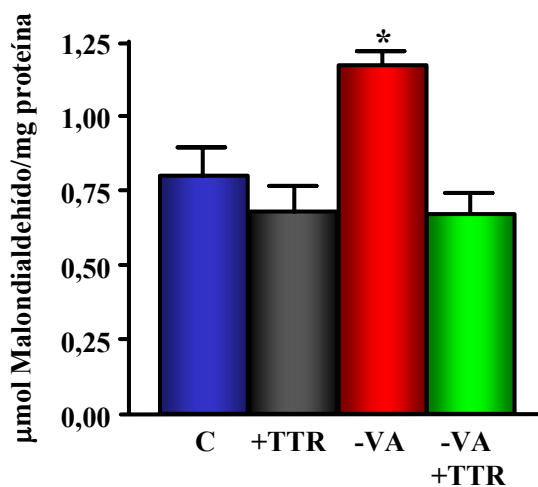




y col., 2003). En base a estos hallazgos, en el siguiente apartado se valoró si la deficiencia de VA puede alterar los sistemas de defensa antioxidantes en el hipocampo de la rata.

### A.6.1. Peroxidación lipídica

Como se ha descrito en el apartado 2.3 de la **Introducción**, el SNC es especialmente sensible al estrés oxidativo debido a la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que contiene, que son las macromoléculas más sensibles a la oxidación (Sayre y col., 2008). Por ello, medir el grado de peroxidación lipídica es un buen indicativo del daño celular producido por las ERO. Como se puede comprobar en la **Figura 53**, la deficiencia de VA aumentó significativamente los niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (malondialdehído), un marcador clásico de peroxidación lipídica. Tras una semana de tratamiento con TTR, estos niveles retornaron al valor control.



**Figura 53: Concentración de malondialdehído, un marcador de peroxidación lipídica, en el hipocampo** de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con TTR (+TTR) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso deficitario en VA (-VA) (■, n=5) y ratas deficitarias en VA tratadas con TTR (-VA+TTR) (■, n=5). Los extractos tisulares desproteinizados con TCA se incubaron con ácido tiobarbitúrico durante 10 minutos en agua hirviendo tras los cuales se leyó la absorbancia a 535 nm. Los datos se presentan como  $\mu$ moles de malondialdehído por mg de proteína y representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes realizados cada uno por duplicado. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ .

### A.6.2. Niveles de glutatión (GSx)

En vista de los resultados obtenidos sobre el grado de peroxidación lipídica, se decidió valorar los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) puesto que, como se ha visto en el apartado 2.2, este tripéptido tiene un importante papel como defensa antioxidante, eliminando del medio celular el peróxido de hidrógeno, entre otros (Shaik y Mehvar, 2006). Como puede verse en la **Tabla 21**, la deficiencia de VA provocó un aumento significativo en los niveles de GSSG en el hipocampo de la rata con respecto al grupo



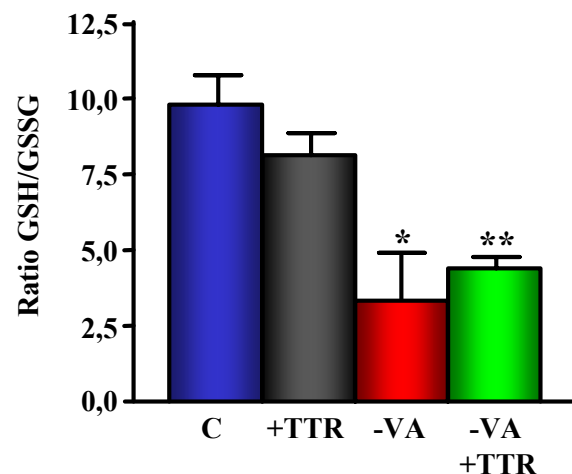


control, así como una disminución significativa de la ratio GSH/GSSG (Figura 54). El tratamiento con TTR de las ratas con deficiencia de VA devolvió los niveles de GSSG al valor control, pero no revirtió el descenso en la ratio GSH/GSSG (Figura 54). Este mismo tratamiento en ratas control no indujo ningún cambio significativo.

	Niveles de glutation ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína)			
	Control	+TTR	-VA	-VA +TTR
<b>GSx</b>	11,5 $\pm$ 1,5	9,4 $\pm$ 2,0	14,1 $\pm$ 2,3	8,9 $\pm$ 1,7
<b>GSH</b>	10,4 $\pm$ 1,3	8,4 $\pm$ 1,9	9,2 $\pm$ 3,1	7,3 $\pm$ 1,5
<b>GSSG</b>	1,0 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2	<b>4,8 <math>\pm</math> 2,8*</b>	1,6 $\pm$ 0,2

**Tabla 21:** Niveles de glutation total (GSx), reducido (GSH) y oxidado (GSSG) presentes en hipocampo de ratas control (n=5), ratas tratadas con TTR (+TTR, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VA (-VA, n=5) y ratas alimentadas con un pienso sin VA y tratadas posteriormente con TTR (-VA+TTR, n=5) procedentes de los cuatro grupos experimentales. Cada valor representa la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: \* p<0,05.

**Figura 54:** Ratio entre los niveles de glutation reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en hipocampo de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con TTR (+TTR) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso deficitario en VA (-VA) (■, n=5) y ratas deficitarias en VA y posteriormente tratadas con TTR (-VA+TTR) (■, n=5). Los valores se presentan como la media  $\pm$  E.S.M de cinco experimentos realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: \* p<0,05; \*\* p<0,01.

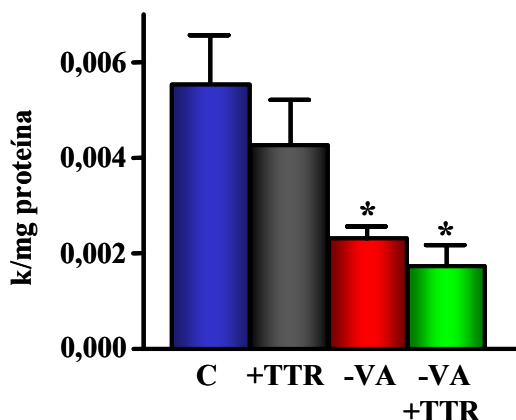




### A.6.3. Actividades catalasa y superóxido dismutasa

#### A.6.3.1. Actividad catalasa (CAT)

Otro importante sistema de defensa antioxidante es la enzima catalasa (CAT), encargada también de eliminar el peróxido de hidrógeno del medio celular. Dado que la deficiencia de VA aumentó significativamente los niveles de GSSG en el hipocampo de la rata, procedimos a continuación a esclarecer si la actividad CAT estaba alterada en este grupo experimental. La [Figura 55](#) muestra una disminución significativa de la actividad CAT en los extractos citosólicos del hipocampo de las ratas alimentadas con un pienso sin VA. El tratamiento posterior de estas ratas con TTR no logró revertir la actividad CAT al valor control.

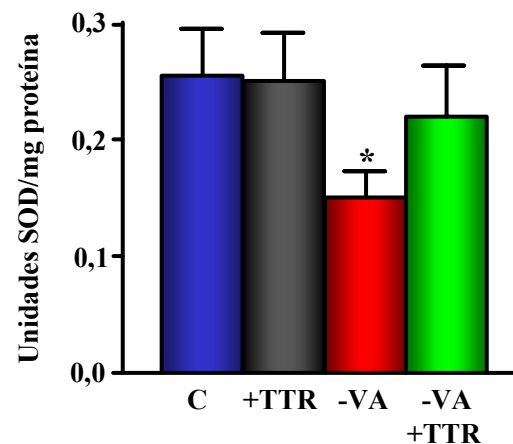


**Figura 55:** Actividad catalasa (CAT) en extractos de hipocampo de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con TTR (+TTR) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso deficitario en VA (-VA) (■, n=5) y ratas deficitarias en VA y tratadas posteriormente con TTR (-VA+TTR) (■, n=5). Una alícuota de extracto se incubó con PBS 0,05 M pH 7,0 en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se registró la disminución de la absorbancia (k) a 240 nm durante cinco minutos. Los datos se presentan como la media ± E.S.M. de cinco experimentos realizados cada uno por duplicado. Comparación estadística frente al control: \* p<0,05.

#### A.6.3.2. Actividad superóxido dismutasa (SOD)

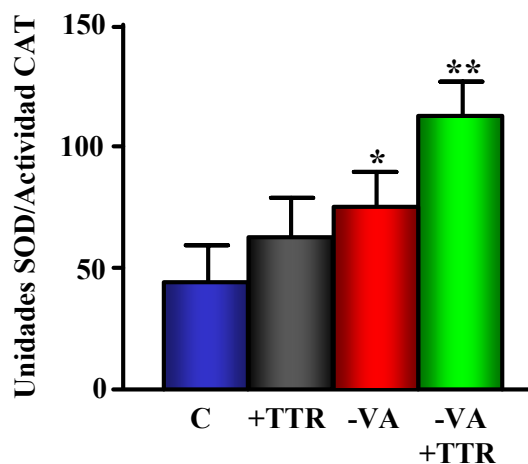
Además de la CAT, la SOD también participa en la defensa antioxidante del organismo, catalizando la transformación del radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•</sup>) en peróxido de hidrógeno. Se analizó la actividad SOD total en extractos de hipocampo para averiguar si la deficiencia de VA altera la actividad de esta enzima. En la [Figura 56](#) puede verse que la deficiencia de VA disminuye significativamente la actividad SOD en hipocampo de rata. El tratamiento de estas ratas con TTR durante una semana revertió la actividad SOD al valor del grupo control mientras que la administración de esta vitamina a las ratas control no ejerció ningún efecto significativo.

**Figura 56: Actividad superóxido dismutasa (SOD) en extractos de hipocampo** de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con TTR (+TTR) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VA (-VA) (■, n=5) y ratas deficitarias en VA y tratadas posteriormente con TTR (-VA+TTR) (■, n=5). Una unidad de actividad SOD se define como la actividad que produce una inhibición del 50% en la reducción del azul de nitrotetrazolio, colorante que en presencia del radical superóxido se reduce y cambia de color amarillo a color azul. Los datos se presentan como la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos realizados cada uno por duplicado. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ .



#### A.6.3.3. Relación entre las actividades superóxido dismutasa y catalasa

Una vez analizadas las actividades de la SOD y de la CAT, el siguiente paso fue analizar la relación existente entre ambas actividades, ya que se ha demostrado que un desequilibrio a este nivel puede conducir a un aumento progresivo en los niveles celulares de peróxido de hidrógeno, aumentando el riesgo de generar radicales hidroxilo, uno de los principales culpables del daño a las macromoléculas (de Oliveira y col., 2007). El grupo de ratas alimentado con un pienso sin VA mostró un desequilibrio significativo entre la actividad SOD y la CAT con respecto al grupo de ratas control (Figura 57). El posterior tratamiento de estas ratas durante una semana con TTR no logró revertir la relación entre ambas actividades al valor control mientras que la administración de TTR a las ratas control no indujo cambios en la relación SOD/CAT ( $p > 0,05$ ).



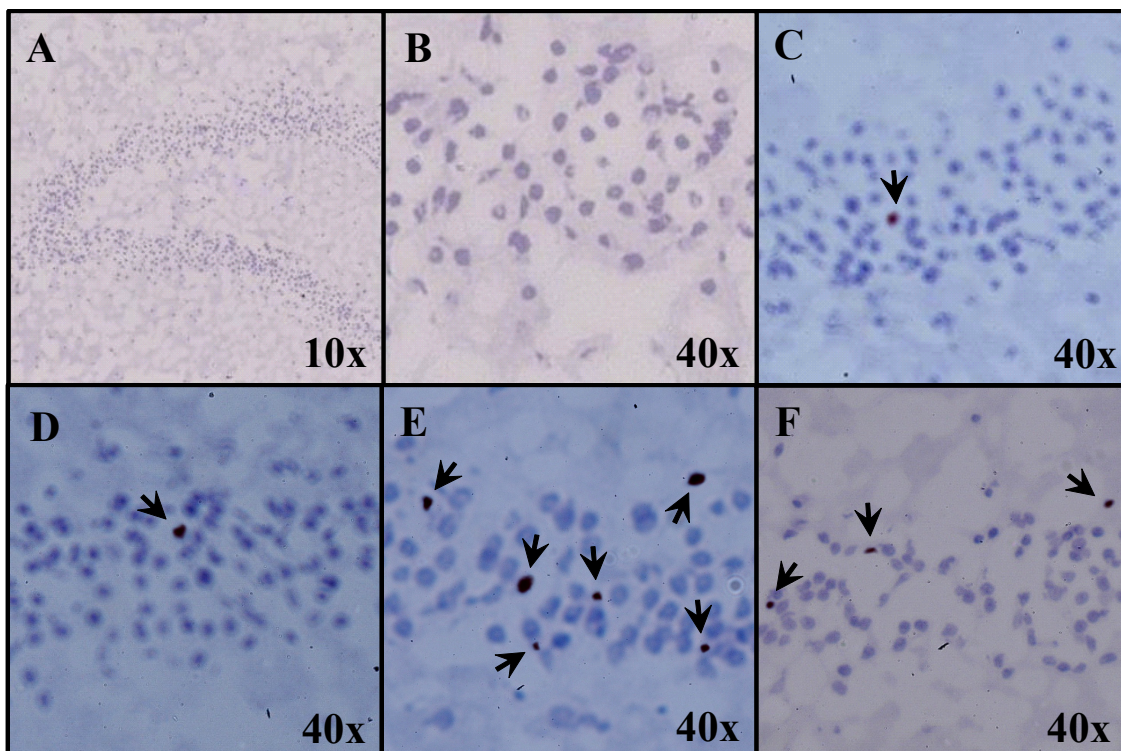
**Figura 57: Relación entre las unidades de superóxido dismutasa (SOD) y la actividad catalasa (CAT) en extractos de hipocampo** de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con TTR (+TTR) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VA (-VA) (■, n=5) y ratas deficitarias en VA y tratadas posteriormente con TTR (-VA+TTR) (■, n=5). Los datos se presentan como la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



## A.7. EFECTOS DE LA VITAMINA A SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

### A.7.1. Apoptosis de células hipocampales

Dado que en el grupo de ratas deficitarias en VA se encontró un incremento en los marcadores de estrés oxidativo, una disminución en la actividad y expresión de la AC y un descenso en la fosforilación de CREB, alteraciones que revirtieron, parcial- o totalmente, tras la administración de TTR, se planteó la hipótesis de que la deficiencia de VA pudiera incrementar la muerte neuronal. Para evaluar esta hipótesis, se realizó una tinción *in situ* de núcleos apoptóticos de hipocampo mediante la técnica del TUNEL y, posteriormente, se evaluaron los cortes al microscopio óptico. Como se puede ver en la **Figura 58**, las ratas alimentadas con un pienso deficitario en VA presentan un mayor número de células TUNEL(+) en comparación con el grupo control, lo que indica un incremento en los procesos de muerte celular programada. El tratamiento de estas ratas con TTR durante una semana disminuyó el número de células TUNEL(+) mientras que en ratas control, la administración de TTR no ejerció ningún efecto significativo.



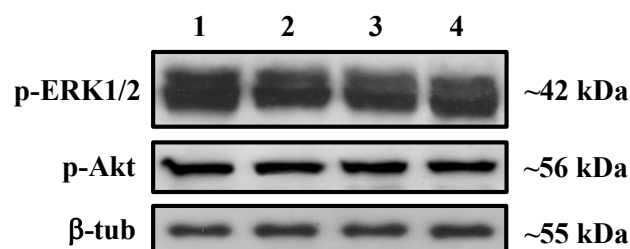
**Figura 58:** Tinción TUNEL de cortes histológicos de hipocampo. **A:** Control negativo de la tinción, región del giro dentado (GD). **B:** Control negativo de la tinción, detalle de los núcleos del GD contrastados con hematoxilina. **C:** Grupo control. **D:** Grupo control tratado con TTR. **E:** Grupo alimentado con un pienso sin VA. **F:** Grupo alimentado con un pienso sin VA y tratado posteriormente con TTR. Las flechas señalan los núcleos TUNEL(+). Se muestra una fotografía representativa de cinco tinciones independientes.

### **A.7.2. Análisis de vías implicadas en la muerte y la supervivencia celular**

Se ha descrito en la bibliografía que, en respuesta temprana al estrés oxidativo, se activan en las células vías antagónicas que favorecen tanto la supervivencia celular como la muerte celular por apoptosis (Kuwabara y col., 2008). A la vista del incremento en el número de células TUNEL(+) en el hipocampo de las ratas con deficiencia de VA, se decidió también analizar la actividad de alguna de estas vías para evaluar su posible implicación en dicho aumento.

#### **A.7.2.1. Fosforilación de ERK1/2 y Akt/PKB**

Dos de las principales vías que se activan de forma temprana en respuesta al estrés oxidativo (Kuwabara y col., 2008) son las que conducen a la fosforilación y activación de la quinasa dependiente de estímulos extracelulares (ERK1/2) (Xia y col., 1995) y de la proteína quinasa B (PKB), también conocida como Akt (Kops y Burgering, 1999). Estas vías, además, están implicadas en los procesos de supervivencia celular (Kuwabara y col., 2008). Dado que la deficiencia de VA incrementó los niveles de peroxidación lipídica en el hipocampo de la rata, decidimos averiguar si estas vías se encontraban alteradas en el grupo de ratas alimentadas con un pienso sin VA. Como muestra la [Figura 59](#), no se encontraron cambios en la fosforilación de estas proteínas en ninguno de los grupos experimentales analizados.

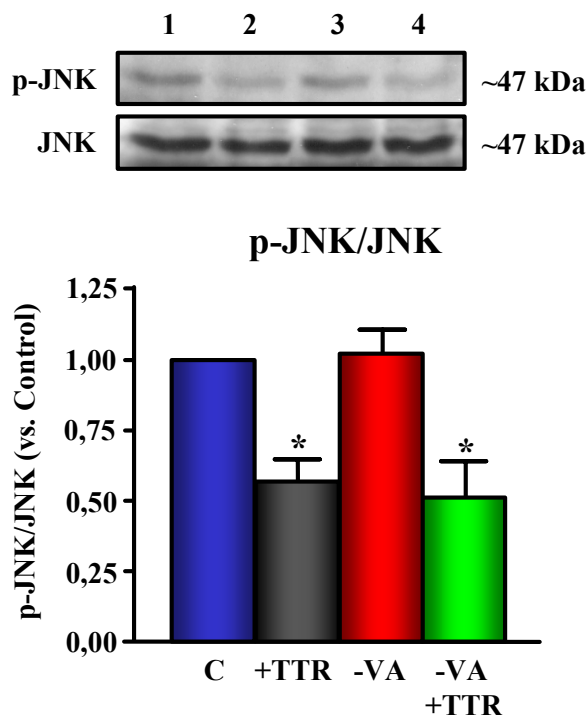


**Figura 59:** Autorradiografías derivadas de los inmunoblots de ERK fosforilada (p-ERK1/2) y Akt fosforilada (p-Akt) en extractos de hipocampo de rata. El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con TTR (n=5), el carril 3 a ratas alimentadas con un pienso sin VA (n=5) y el carril 4 a ratas alimentadas con un pienso sin VA y tratadas posteriormente con TTR (n=5). Se muestra el correspondiente control de carga realizado con β-tubulina (β-tub), detectada mediante un anticuerpo específico. Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados.



### A.7.2.2. Fosforilación de SAPK/JNK

Otra vía que se activa en respuesta a un estrés oxidativo es la vía de la proteína quinasa activada por estrés (SAPK, por sus siglas en inglés), también denominada JNK (Davis, 2000). Se ha descrito que la activación de esta vía puede conducir a procesos de apoptosis y, por tanto, disminuir la supervivencia neuronal (Kuwabara y col., 2008). Por ello, se decidió analizar los niveles de SAPK/JNK fosforilada (p-SAPK/JNK) tras 12 semanas de deficiencia de VA. La **Figura 60** muestra que los niveles de p-SAPK/JNK en el grupo de ratas alimentadas con un pienso sin VA son similares a los del grupo control. Sin embargo, en el hipocampo de las ratas tratadas con TTR, se observa una disminución significativa en la fosforilación de p-SAPK/JNK en comparación con el grupo control.



**Figura 60. Panel superior: Autorradiografías derivadas de los inmunoblots de JNK y p-JNK en hipocampo.** El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con TTR (n=5), el carril 3 a ratas alimentadas con un pienso sin VA (n=5) y el carril 4 a ratas alimentadas con un pienso sin VA y tratadas posteriormente con TTR (n=5). Las autorradiografías son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. **Panel inferior: Relación entre la densidad de las bandas de p-JNK y las correspondientes bandas de JNK presentes en extractos de hipocampo** de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con TTR (+TTR) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VA (VA) (■, n=5) y ratas deficitarias en VA y tratadas con TTR (-VA+TTR) (■, n=5). Los valores se presentan en relación al valor del grupo control, a cuya relación p-JNK/JNK se le asignó un valor arbitrario de 1. Los datos representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ .



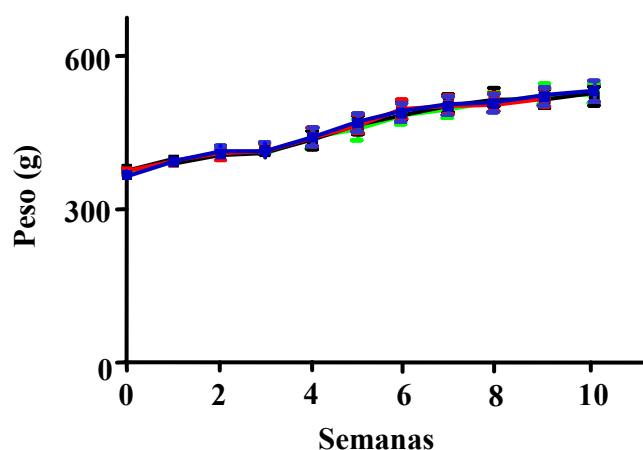


## B. VITAMINA E

Diversos estudios indican que la supervivencia neuronal es potenciada por el  $\alpha$ -tocoferol y modulada por el AMPc y se sabe que la activación de los SSTR, a través de la inhibición de la AC, conduce a una disminución en los niveles intracelulares del AMPc. Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento con VE ayuda a paliar las pérdidas de memoria y los trastornos cognitivos asociados a la edad, funciones que también están reguladas por la SST. No obstante, hasta la fecha, se desconoce si el  $\alpha$ -tocoferol puede estimular la supervivencia neuronal o regular las funciones cognitivas a través de la regulación del sistema somatostatinérgico. Por todo ello, en este segundo bloque de resultados, se analizan los efectos de la VE y/o de su deficiencia sobre el sistema receptor-efector de la SST y sobre la supervivencia neuronal en el hipocampo de la rata Sprague-Dawley macho.

### B.1. EFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE VITAMINA E SOBRE EL PESO CORPORAL

Se inició el estudio con la valoración de los signos clínicos de la deficiencia de VE en las ratas Sprague-Dawley. Tras 9 semanas de ser alimentadas con un pienso sin VE, las ratas no mostraron ningún síntoma visible de deficiencia vitamínica ni cambios en el peso corporal (Figura 61).

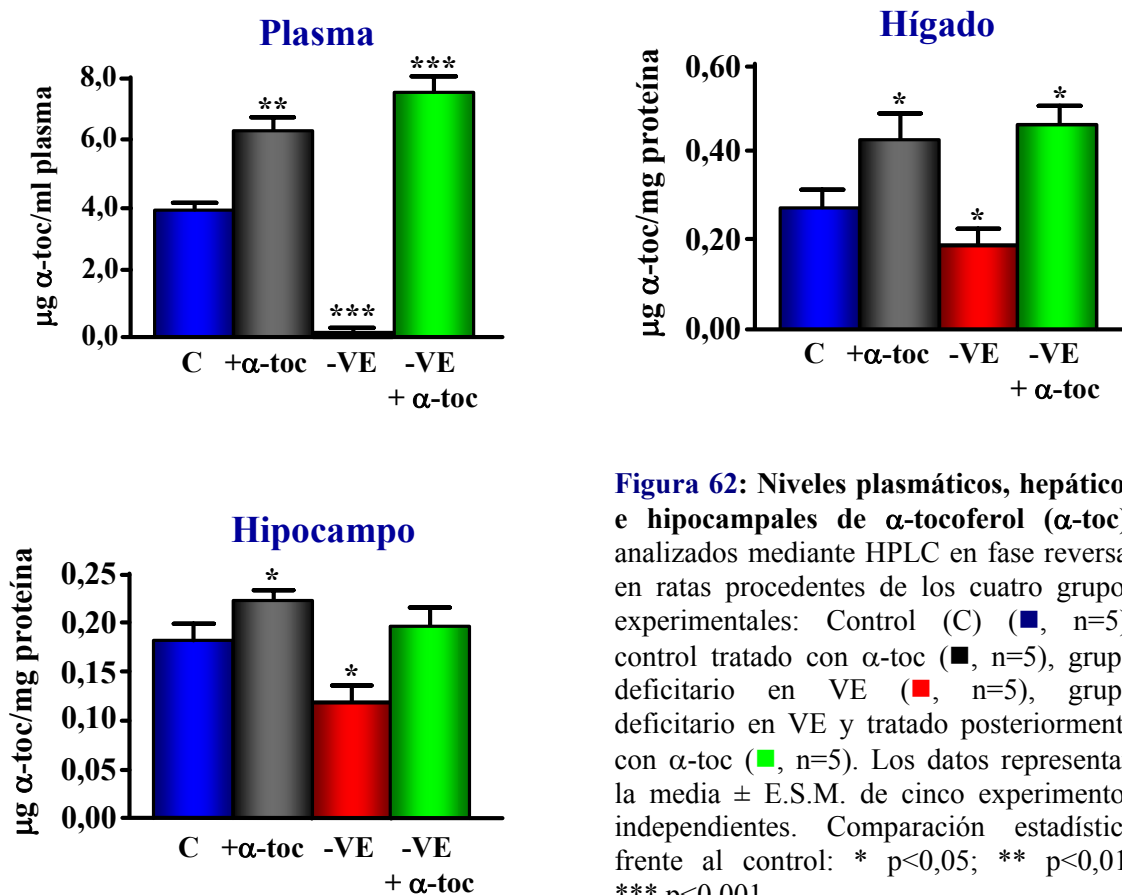


**Figura 61:** Evolución del peso de las ratas control (■, n=5), ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -toc) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VE (■, n=5) y ratas alimentadas con un pienso sin VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -toc (■, n=5). Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de cinco ratas.



## B.2. NIVELES DE VITAMINA E EN PLASMA, HÍGADO E HIPOCAMPO

Como control del modelo de deficiencia de VE y/o del posterior tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol, se analizaron los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma, el hígado y el hipocampo de las ratas después de cada inducción. Como puede verse en la [Figura 62](#), después de 9 semanas de ser alimentadas con un pienso sin VE, las ratas presentaron una depleción casi total del contenido de  $\alpha$ -tocoferol en plasma y una disminución significativa en los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado e hipocampo con respecto a las ratas control. Las ratas control tratadas con  $\alpha$ -tocoferol durante una semana presentaron un incremento significativo en los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en las tres muestras analizadas. Por otro lado, las ratas deficitarias en VE y tratadas con inyecciones de  $\alpha$ -tocoferol mostraron un incremento significativo de esta molécula en plasma e hígado y una tendencia al alza en el hipocampo. Las concentraciones observadas son coherentes con los resultados publicados por otros autores (Franco-Mdo y col., 2003; Cuppini y col., 2001).



**Figura 62:** Niveles plasmáticos, hepáticos e hipocámpales de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -toc), analizados mediante HPLC en fase reversa, en ratas procedentes de los cuatro grupos experimentales: Control (C) (■, n=5), control tratado con  $\alpha$ -toc (■, n=5), grupo deficitario en VE (■, n=5), grupo deficitario en VE y tratado posteriormente con  $\alpha$ -toc (■, n=5). Los datos representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.





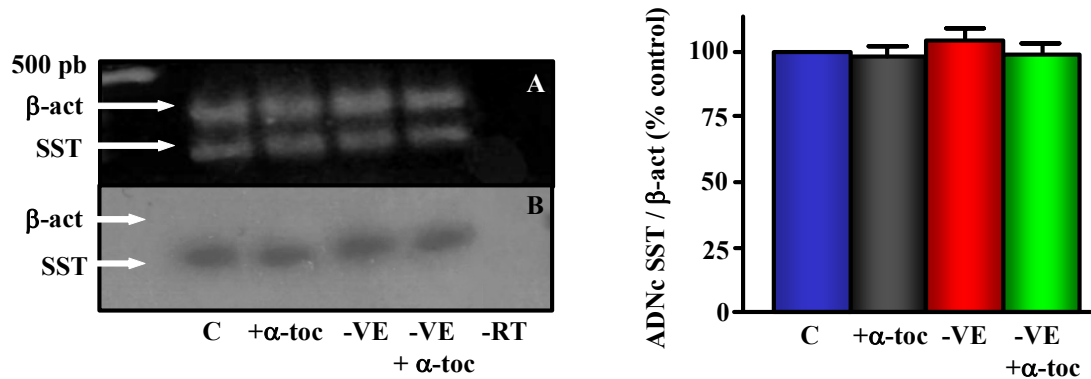
### B.3. EFECTOS DE LA VITAMINA E SOBRE EL SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO

#### B.3.1. Expresión del gen de la somatostatina

Para valorar los efectos de la VE sobre el sistema somatostatinérgico de la rata, se procedió a analizar, en primer lugar, la expresión de la SST. En las ratas sometidas a una alimentación con un pienso sin VE durante 9 semanas, no se detectaron cambios significativos en los niveles hipocampales de somatostatina inmunorreactiva (SST-IR) (Tabla 22) ni en los niveles de ARNm de la SST (Figura 63) en comparación con el grupo control. El tratamiento de dichas ratas con  $\alpha$ -tocoferol (200 mg/kg/día) durante una semana tampoco modificó los valores de estos parámetros respecto a las ratas control. Se obtuvieron resultados similares en las ratas control tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (Tabla 22, Figura 63).

Grupos	SST-IR (ng/mg proteína)
Control	14,7 $\pm$ 0,5
+ $\alpha$ -toc	14,3 $\pm$ 1,8
-VE	13,9 $\pm$ 0,3
-VE+ $\alpha$ -toc	14,8 $\pm$ 2,0

**Tabla 22: Concentración de somatostatina inmunorreactiva (SST-IR), determinada mediante radioinmunoanálisis (RIA), en el hipocampo de las ratas.** Control: ratas alimentadas con un pienso estándar durante 9 semanas y tratadas con vehículo durante 1 semana; + $\alpha$ -toc: ratas control tratadas con inyecciones i.p. de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -toc) (200 mg/kg/día) durante 1 semana; -VE: ratas alimentadas durante 9 semanas con un pienso sin VE; -VE+ $\alpha$ -toc: ratas alimentadas durante 9 semanas con un pienso sin VE y tratadas posteriormente durante una semana con inyecciones i.p. de  $\alpha$ -tocoferol (200 mg/kg/día). Los datos se presentan como la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes realizados por duplicado. No se aprecian cambios significativos en ninguno de los grupos experimentales.

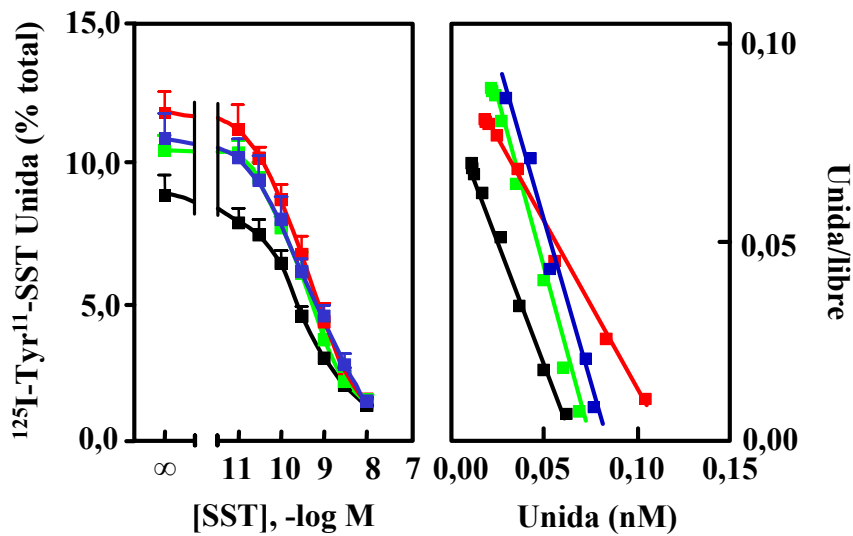


**Figura 63. Panel izquierdo: Detección del ARNm de la somatostatina (SST) mediante RT-PCR (A) y Southern-blot (B) en el hipocampo de ratas procedentes de los cuatro grupos experimentales. C:** control; + $\alpha$ -toc: ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol; -VE: ratas alimentadas con un pienso sin VE; -VE+ $\alpha$ -toc: ratas alimentadas con un pienso sin VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol. El ARN total aislado y purificado fue sometido a 30 ciclos de amplificación con cebadores específicos para la SST y la  $\beta$ -actina ( $\beta$ -act). El producto de la reacción se corrió en un gel de agarosa, se tiñó con bromuro de etidio y, posteriormente, fue hibridado con una sonda específica para SST marcada con  $^{32}\text{P}$  y autorradiografiada a  $-70^\circ\text{C}$ . Como control de contaminación, se realizó un control negativo (-RT) que no contenía muestra. **Panel derecho: Análisis densitométrico de las bandas específicas de la SST** obtenidas por Southern-blot. Los valores se representan en % respecto al grupo control, a cuya densidad óptica se le dio un valor de 100%. Los valores se presentan como la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos diferentes.

### B.3.2. Receptores de somatostatina

#### **B.3.2.1. Parámetros de unión de la somatostatina a sus receptores**

A continuación, se realizaron ensayos de unión competitiva con el trazador  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST-14}$  con el fin de determinar la capacidad máxima de unión ( $B_{\text{max}}$ ) y la afinidad de los receptores de SST presentes en membranas de hipocampo de rata. En las membranas del hipocampo procedente de las ratas deficitarias en VE, se observó un aumento significativo en el valor de  $B_{\text{max}}$  así como en su constante de disociación ( $K_d$ ). El tratamiento de dichas ratas con  $\alpha$ -tocoferol durante una semana (200 mg/kg/día) revirtió dichos parámetros a los valores control. Sin embargo, cabe destacar que el tratamiento de las ratas control con  $\alpha$ -tocoferol provocó una disminución significativa del número de sitios de unión para la SST y un aumento de su  $K_d$  con respecto al grupo de ratas control tratadas sólo con el vehículo. (Figura 64, Tabla 23). Las membranas procedentes del hipocampo de los cuatro grupos experimentales presentaron niveles similares de degradación de la SST, con una variación no superior al 10%.



**Figura 64.** Efectos de la vitamina E (VE) sobre la unión de la SST a sus receptores. **Panel izquierdo:** Inhibición competitiva de la unión de la  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST-14}$  a membranas de hipocampo de rata por SST fría. Las membranas se incubaron durante 60 minutos a  $30^\circ\text{C}$  en presencia de 250 pM de  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST-14}$  y concentraciones crecientes del péptido nativo. Los puntos corresponden a ratas control (■, n=5), ratas control tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (■, n=5), ratas deficitarias en VE (■, n=5) y ratas deficitarias en VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (■, n=5). Cada punto representa la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. **Panel derecho:** Análisis de Scatchard de los datos de unión. Los correspondientes parámetros de equilibrio se muestran en la [Tabla 23](#).

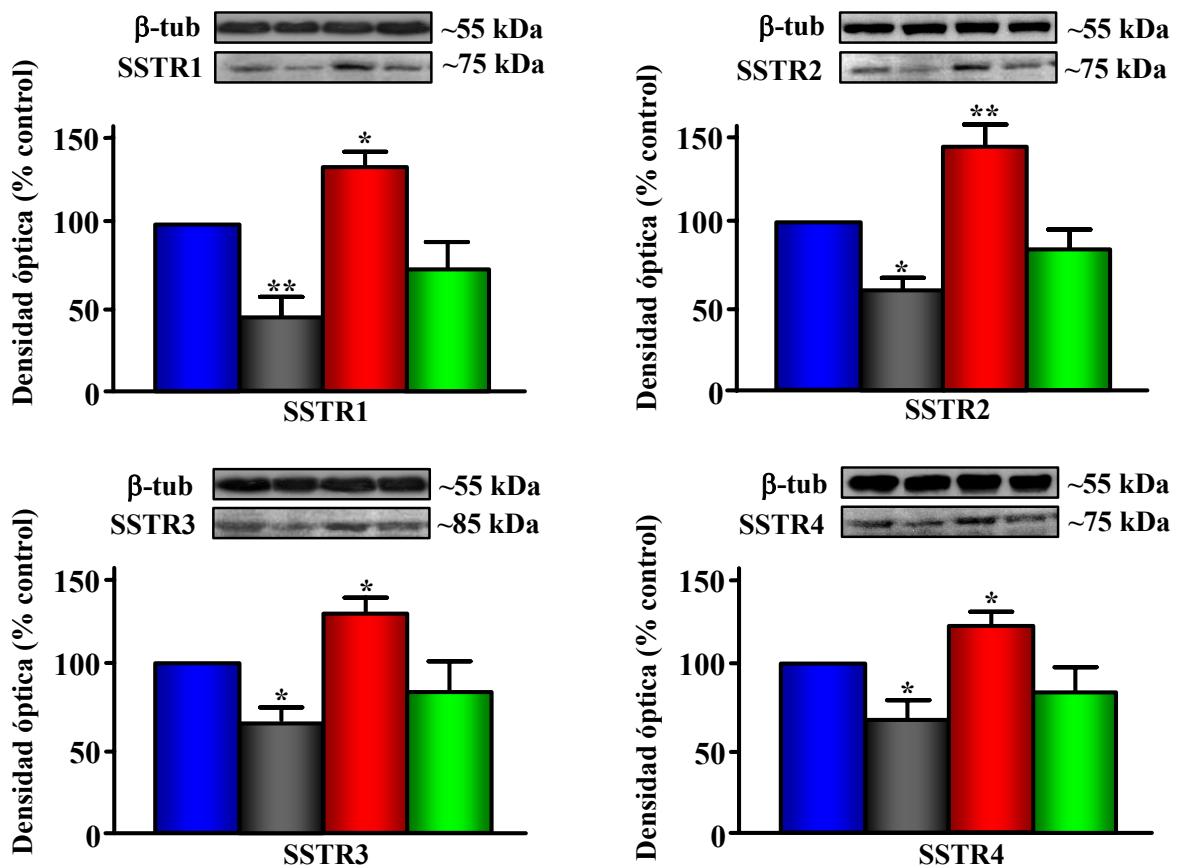
Grupos	Receptores de SST	
	Bmax	Kd
Control	511,3 $\pm$ 44,1	0,54 $\pm$ 0,19
+ $\alpha$ -toc	428,1 $\pm$ 32,1*	0,83 $\pm$ 0,10*
-VE	764,0 $\pm$ 29,4*	1,08 $\pm$ 0,20*
-VE + $\alpha$ -toc	484,9 $\pm$ 58,7	0,50 $\pm$ 0,04

**Tabla 23:** Efecto de la vitamina E (VE) sobre los parámetros de equilibrio de la unión de la SST a sus receptores en membranas de hipocampo de ratas control, ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (+ $\alpha$ -toc), ratas deficitarias en VE (-VE) y ratas deficitarias en VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (-VE + $\alpha$ -toc). Los parámetros de equilibrio se calcularon a partir del análisis de Scatchard por regresión lineal. Las unidades para la Kd son nM y para la Bmax femtomoles de SST unida por mg de proteína. Los valores se expresan como la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ .



### B.3.2.2. Expresión de los receptores de somatostatina

Dado que se encontraron cambios en los parámetros de unión de la SST a sus receptores en el grupo de ratas deficitarias en VE así como en el grupo de ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol, nos planteamos averiguar si la VE modifica la expresión de alguno de los subtipos expresados normalmente en el hipocampo (SSTR1-SSTR4). Para ello, analizamos primero los niveles proteicos de SSTR1-SSTR4 en membranas de hipocampo mediante inmunoblot con anticuerpos específicos. Posteriormente, analizamos los niveles de ARNm de dichos receptores mediante PCR a tiempo real.

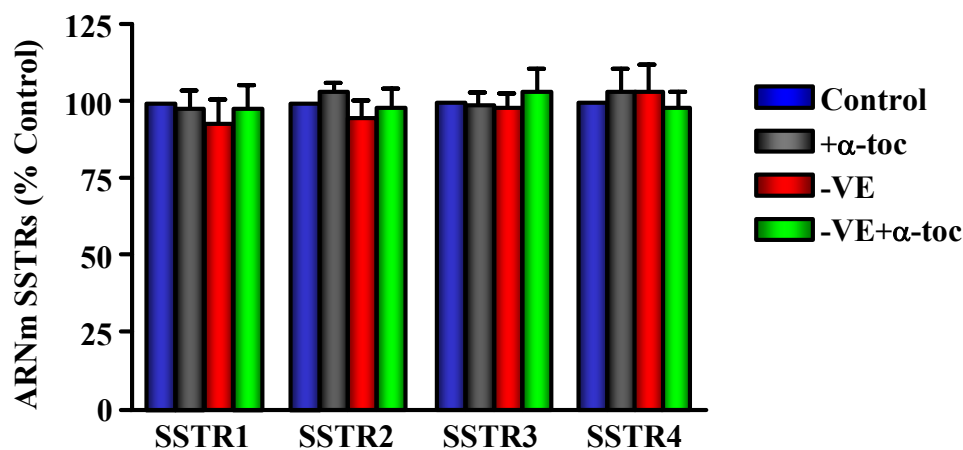


**Figura 65:** Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de los receptores de somatostatina (SSTR) (SSTR1-SSTR4) presentes en el hipocampo de ratas control (■, n=5), ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VE (■, n=5) y ratas alimentadas con un pienso sin VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (■, n=5). Se muestra el correspondiente control de carga realizado con  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub), detectada mediante un anticuerpo monoclonal. La densidad óptica se presenta como un porcentaje del control, a cuya densidad, una vez normalizada con la  $\beta$ -tub, se le asignó un valor arbitrario de 100%. Los datos representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



La Figura 65 demuestra que la deficiencia de VE aumenta significativamente los niveles proteicos de los 4 subtipos de SSTR estudiados en comparación con las ratas control. Además, la administración de  $\alpha$ -tocoferol durante una semana a las ratas alimentadas con un pienso sin VE devolvió los niveles proteicos SSTR1-SSTR4 a los valores control, aunque todos ellos mostraron una tendencia a la baja estadísticamente no significativa. Por otro lado, en ratas alimentadas con un pienso estándar A04, la administración de  $\alpha$ -tocoferol indujo una disminución significativa en los niveles proteicos de SSTR1-SSTR4 en el hipocampo (Figura 65).

Por otro lado, no se encontraron cambios significativos en los niveles del ARNm de los SSTR en ninguno de los grupos experimentales analizados (Figura 66).



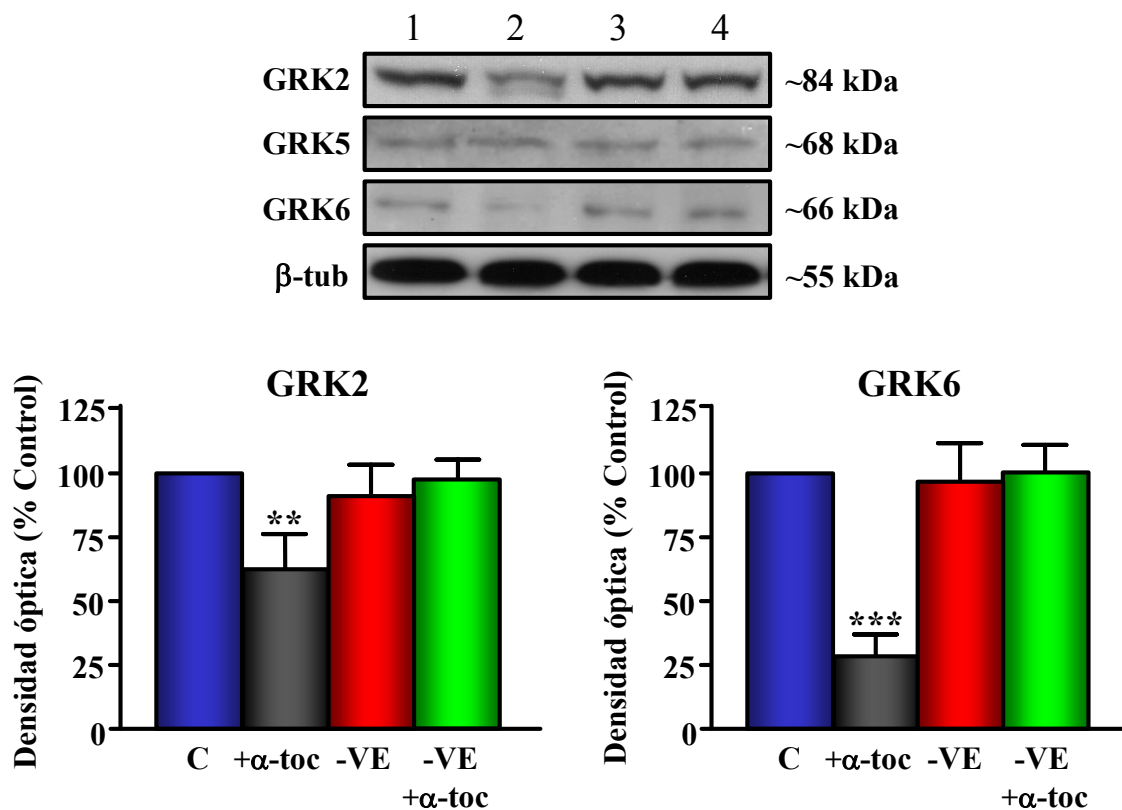
**Figura 66:** Ratio relativa de ARNm de los distintos subtipos de receptores de somatostatina (SSTR) determinado mediante PCR a tiempo real en hipocampo de ratas control (n=5), ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (+ $\alpha$ -toc, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin vitamina E (-VE, n=5) y ratas alimentadas con un pienso sin VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (-VE+ $\alpha$ -toc, n=5). El ARNm aislado del hipocampo de las ratas se sometió a una reacción de transcripción inversa y, posteriormente, fue amplificado mediante PCR a tiempo real con cebadores específicos para los subtipos de SSTR y para  $\beta$ -actina, usada como gen control. La cantidad de ARNm inicial se calculó aplicando la ecuación de Pfaffl y se expresa en % respecto al grupo control, al que se le dio un valor arbitrario de 100%. Los datos expresan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos diferentes, realizado cada uno por triplicado. No se observan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales analizados.

### **B.3.3. Expresión de las quinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRK)**

Con el fin de profundizar en la base molecular de las alteraciones de los SSTR, nos planteamos examinar los niveles proteicos de las distintas GRK presentes en las membranas de hipocampo de rata, ya que una mayor o menor disponibilidad de las mismas podría



contribuir a una alteración en la fosforilación y, por tanto, en la tasa de internación de dichos receptores. Como puede verse en la [Figura 67](#), el tratamiento de las ratas control con  $\alpha$ -tocoferol durante una semana indujo una disminución significativa en los niveles de GRK2 (40%) y de GRK6 (71%) en membranas de hipocampo en comparación con el grupo control, que recibió sólo el vehículo; mientras que no se detectaron cambios significativos en estas quinasas en el grupo de ratas con deficiencia de VE o en el grupo de ratas con deficiencia de VE que fueron tratadas con  $\alpha$ -tocoferol. Por último, no se modificó la expresión de GRK5 en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas.



**Figura 67. Panel superior:** Autorradiografías derivadas de los inmunoblots de los subtipos 2, 5 y 6 de las quinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRK2, GRK5, GRK6) en hipocampo de rata. El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (n=5), el carril 3 a ratas alimentadas con un pienso sin VE (n=5) y el carril 4 a ratas alimentadas con un pienso sin VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Como control de carga, se empleó  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub), detectada mediante un anticuerpo monoclonal. **Panel inferior:** Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de GRK2 y GRK6 presentes en el hipocampo de ratas control (C, ■), ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (+ $\alpha$ -toc, ■), ratas alimentadas con un pienso sin VE (-VE, ■) y ratas deficitarias en VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (-VE+ $\alpha$ -toc, ■). Las densidades ópticas se presentan como porcentajes del control, a cuya densidad, una vez normalizada con la  $\beta$ -tub, se le asignó un valor arbitrario de 100%. Los datos representan las media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

**B.3.4. Efectos de la vitamina E sobre la vía de la adenilato ciclasa****B.3.4.1. Actividad adenilato ciclasa**

Una vez comprobados los efectos de la VE sobre los SSTR, se estudió la funcionalidad de dichos receptores en condiciones de deficiencia de VE o tras el tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol mediante el estudio de la actividad de la AC, uno de los principales efectores acoplados, vía proteínas Gi, a los SSTR. Se analizó la actividad de esta enzima tanto en condiciones basales como estimuladas por FK así como la capacidad de la SST para inhibir dichas actividades. Como muestra la *Tabla 24*, se observó un aumento significativo de la actividad AC basal y estimulada por FK en el grupo de ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol en comparación con las ratas control. La SST inhibió la actividad AC basal y estimulada en todos los grupos experimentales estudiados. Sin embargo, la capacidad de la SST para inhibir la AC resultó significativamente menor en las ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol así como en aquellas alimentadas con un pienso sin VE (*Tabla 24*). El tratamiento posterior de las ratas deficitarias en VE con  $\alpha$ -tocoferol revirtió la actividad AC y la capacidad inhibidora de la SST sobre la AC a sus valores control. Las veces de estimulación de la actividad AC por FK fueron similares entre los distintos grupos experimentales analizados.

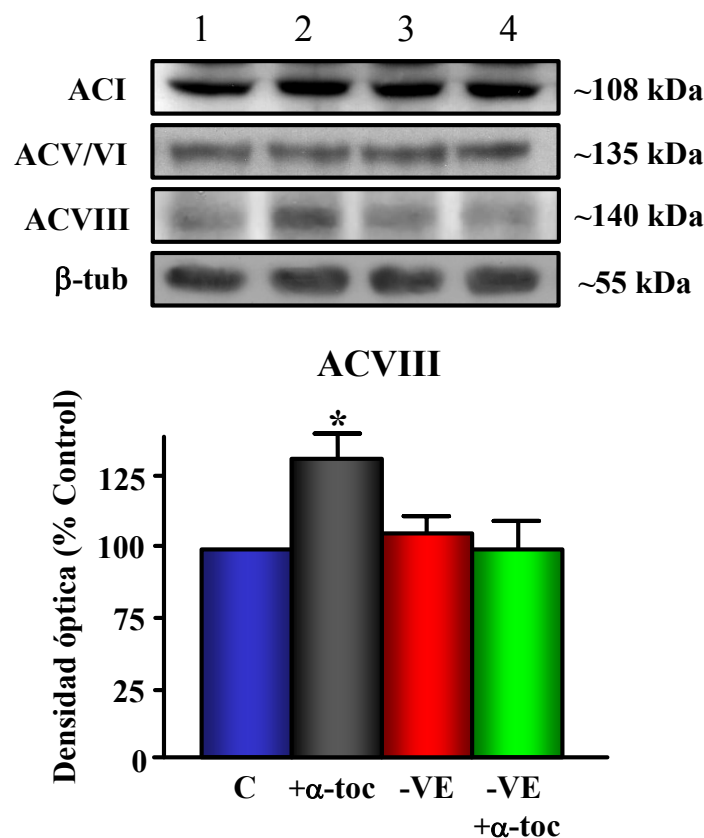
<b>Actividad adenilato ciclasa (pmol AMPc/min/mg de proteína)</b>				
	<b>Control</b>	<b>+<math>\alpha</math>-toc</b>	<b>- VE</b>	<b>-VE +<math>\alpha</math>-toc</b>
<b>Actividad Basal</b>	138,5 $\pm$ 21,6	<b>188,5<math>\pm</math>7,0*</b>	165,7 $\pm$ 22,1	152,9 $\pm$ 30,4
<b>+10<sup>-4</sup> M SST</b>	111,6 $\pm$ 15,1	<b>168,1<math>\pm</math>32,7*</b>	<b>136,8<math>\pm</math>14,6*</b>	123,4 $\pm$ 26,3
<b>+10<sup>-5</sup> M FK</b>	447,5 $\pm$ 85,5	<b>616,4<math>\pm</math>43,1*</b>	458,0 $\pm$ 63,9	473,6 $\pm$ 35,2
<b>+10<sup>-5</sup> M FK +10<sup>-4</sup> M SST</b>	335,4 $\pm$ 75,6	<b>554,1<math>\pm</math>44,6**</b>	369,8 $\pm$ 39,9	321,1 $\pm$ 64,8
<b>Veces de estimulación por FK</b>	2,8 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,7
<b>% Inhibición por SST de la actividad basal</b>	28,1 $\pm$ 4,3	<b>12,1<math>\pm</math>3,1*</b>	<b>17,0<math>\pm</math>2,4*</b>	21,4 $\pm$ 7,9
<b>% Inhibición por SST de la actividad estimulada por FK</b>	26,5 $\pm$ 9,5	<b>12,5<math>\pm</math>8,0*</b>	17,3 $\pm$ 6,0	28,9 $\pm$ 5,7

**Tabla 24:** Efecto de la somatostatina (SST, 10<sup>-4</sup> M) y de la forskolina (FK, 10<sup>-5</sup> M) sobre la actividad adenilato ciclasa en membranas de hipocampo de ratas control (n=5), ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (+ $\alpha$ -toc, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin vitamina E (-VE, n=5) y ratas alimentadas con un pienso sin VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (-VE+ $\alpha$ -toc, n=5). Los valores representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos individuales realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: \* p<0,05; \*\* p<0,01.



### B.3.4.2. Expresión de la adenilato ciclasa

Con el fin de esclarecer si el aumento de la actividad AC inducido por el  $\alpha$ -tocoferol en el hipocampo de la rata se atribuye a una alteración en la expresión de la enzima, procedimos a analizar, mediante inmunoblot, los niveles proteicos de ACV/VI, dos isoformas que se inhiben por proteínas G $\alpha$ i (Sunahara y Taussig, 2002), y los de ACI y ACVIII, ya que son las principales isoformas expresadas en cerebro (Sunahara y Taussig, 2002). Los datos obtenidos mediante el análisis densitométrico de las bandas inmunorreactivas (Figura 68) revelan que el tratamiento de las ratas con  $\alpha$ -tocoferol durante una semana



**Figura 68. Panel superior:** Autorradiografías derivadas de los inmunoblots de los subtipos I, V/VI y VIII de la enzima adenilato ciclasa (AC) en membranas de hipocampo de rata. El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (n=5), el carril 3 a ratas alimentadas con un pienso sin VE (n=5) y el carril 4 a ratas alimentadas con un pienso sin VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (n=5). Las autorradiografías son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Como control de carga se empleó  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub), detectada mediante un anticuerpo monoclonal. **Panel inferior:** Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de ACVIII presentes en membranas de hipocampo de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (+ $\alpha$ -toc) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VE (-VE) (■, n=5) y ratas deficitarias en VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (-VE+ $\alpha$ -toc) (■, n=5). Las densidades ópticas se presentan como porcentajes del control, a cuya densidad, una vez normalizada con la  $\beta$ -tub, se le asignó un valor arbitrario de 100%. Los datos representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*\* p<0,01.

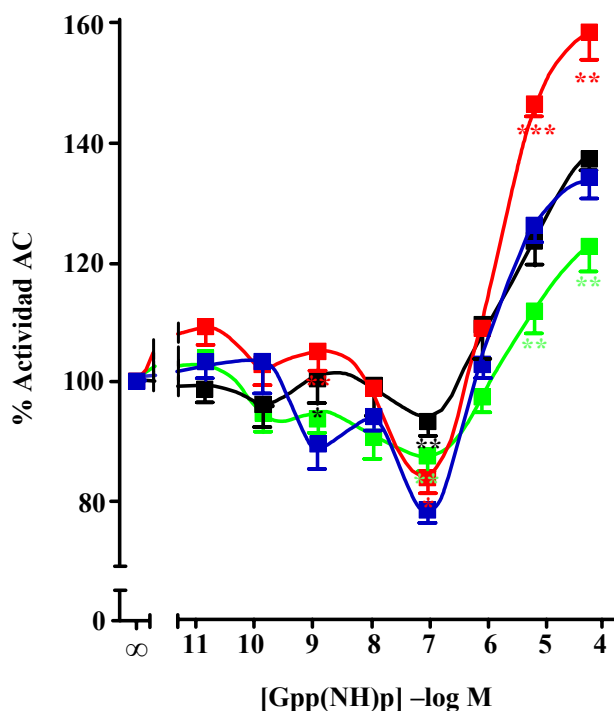




aumenta selectivamente los niveles de la isoforma ACVIII en un ~26%, en comparación con las ratas control, mientras que esta isoforma no se altera en el hipocampo de las ratas deficitarias en VE o en aquellas deficitarias en VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol. No se hallaron cambios en la expresión de ACI y ACV/VI en ninguno de los grupos experimentales analizados (Figura 68).

### B.3.4.3. Funcionalidad y expresión de las proteínas Gi

Hemos demostrado en el apartado anterior que tanto el tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol como la deficiencia de VE disminuyen significativamente la capacidad de la SST para inhibir la AC, un efecto que se correlaciona con la disminución del número de SSTR en las ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol, pero no con el aumento de dichos receptores en las ratas alimentadas sin VE. Por lo tanto, el siguiente paso fue explorar la actividad funcional así como la expresión de las proteínas Gi. Determinamos, en primer lugar, la capacidad de las proteínas Gi activadas para inhibir la enzima AC. Para ello, se incubaron membranas de hipocampo de rata con FK  $3 \times 10^{-6}$  M y concentraciones crecientes de Gpp(NH)p. Los resultados, que se recogen en la Figura 69, muestran que el tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol disminuye significativamente la capacidad de las proteínas Gi para inhibir la AC en comparación con el grupo control. En el grupo de ratas con deficiencia de VE, se observa

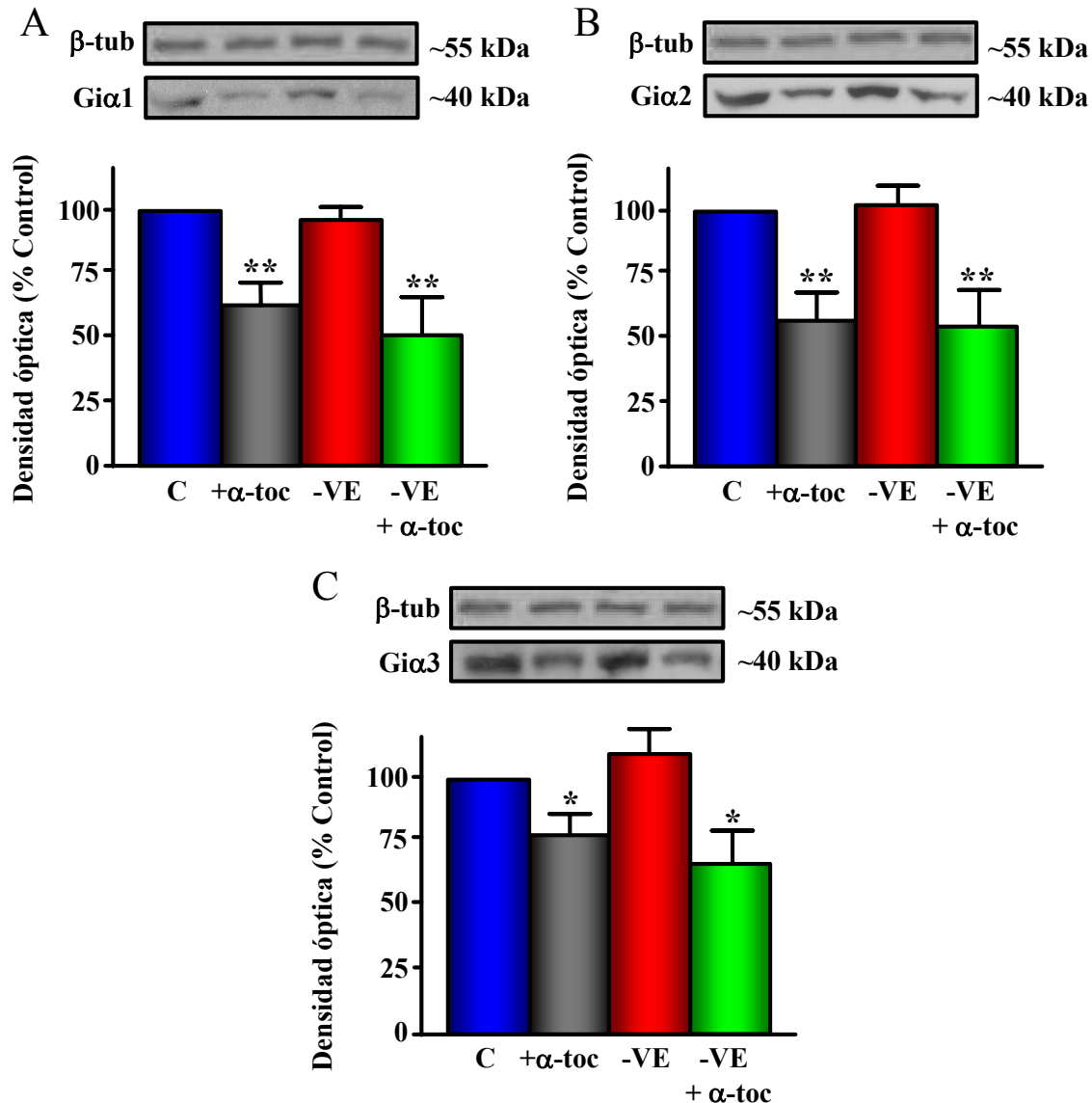


**Figura 69:** Curvas dosis-efecto de inhibición de la adenilato ciclasa (AC) mediada por el 5'-guanililimidodifosfato (Gpp(NH)p) en membranas de hipocampo de ratas control (■, n=5), ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VE (■, n=5) y ratas alimentadas con un pienso sin VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (■, n=5). El efecto del Gpp(NH)p sobre la actividad AC se analizó en presencia de forskolina ( $3 \times 10^{-6}$  M) y la concentración indicada de Gpp(NH)p. Los datos se expresan como un porcentaje de la actividad AC estimulada por FK en ausencia de Gpp(NH)p (100%) y se presentan como la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos distintos realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.



también un descenso significativo en la actividad de las proteínas Gi; el posterior tratamiento de estas ratas con  $\alpha$ -tocoferol no revirtió por completo la funcionalidad de Gi.

Una vez determinado el efecto que el  $\alpha$ -tocoferol y la deficiencia de VE ejercen sobre la actividad funcional de las proteínas Gi, se analizó, mediante inmunoblot, la expresión proteica de las subunidades  $\alpha$ i1,  $\alpha$ i2 y  $\alpha$ i3 en membranas de hipocampo de rata.

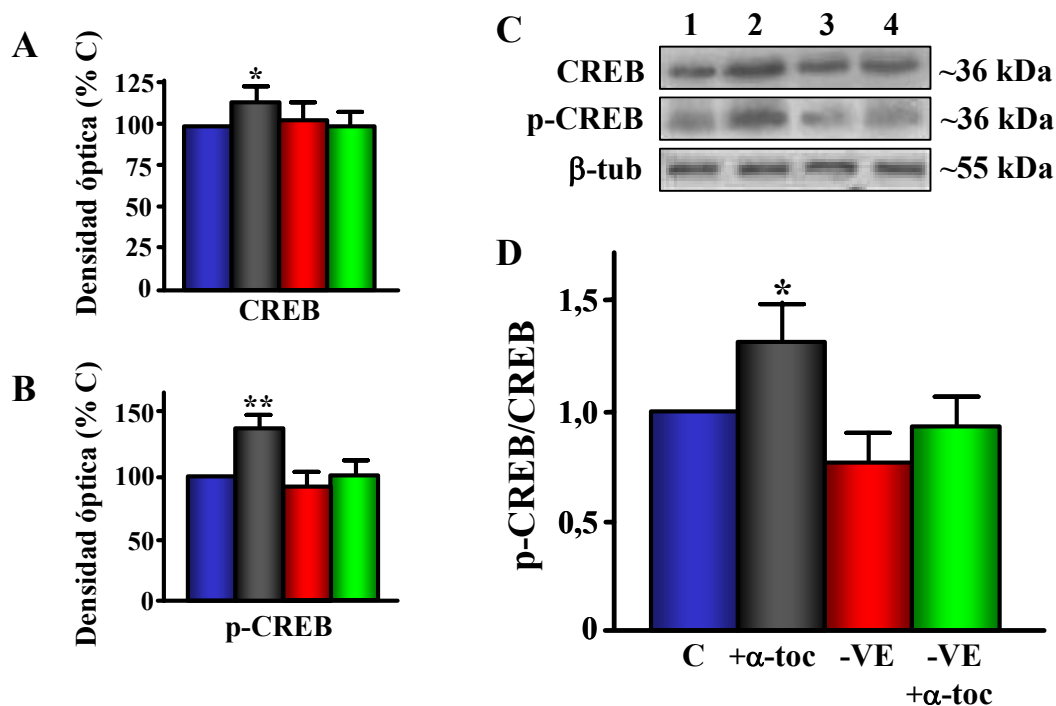


**Figura 70:** Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de Gi $\alpha$ 1 (panel A), Gi $\alpha$ 2 (panel B) y Gi $\alpha$ 3 (panel C) presentes en membranas de hipocampo de ratas control (C) (■ n=5), ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (+ $\alpha$ -toc) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso deficitario en vitamina E (-VE) (■, n=5) y ratas deficitarias en VE tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (-VE+ $\alpha$ -toc) (■, n=5). Como control de carga se empleó un anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub). Las densidades ópticas se presentan como porcentajes del control, a cuya densidad, una vez normalizada con la  $\beta$ -tub, se le asignó un valor arbitrario de 100. Los datos representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Tal como se aprecia en la **Figura 70**, el tratamiento de una semana con  $\alpha$ -tocoferol en ratas control y en ratas alimentadas con un pienso sin VE, disminuyó significativamente los niveles proteicos de las tres subunidades estudiadas en membranas de hipocampo. No se hallaron cambios en el grupo deficitario en VE con respecto al grupo control.

#### B.4. EFECTOS DE LA VITAMINA E SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE CREB

La cascada del AMPc, incluyendo a la proteína CREB, ha sido implicada en procesos de supervivencia y plasticidad neuronal (Barco y col., 2006). En el apartado B.3.4., se pone de manifiesto que el tratamiento de las ratas con  $\alpha$ -tocoferol conduce a un aumento significativo de la actividad AC así como de los niveles de ACVIII en hipocampo. Por todo



**Figura 71. Paneles A y B: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de CREB y p-CREB (Panel C) presentes en membranas de hipocampo de ratas control (Carril 1, C) (■, n=5), ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (Carril 2, + $\alpha$ -toc) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso deficitario en VE (Carril 3, -VE) (■, n=5) y ratas deficitarias en VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (Carril 4, -VE+ $\alpha$ -toc) (■, n=5). La densidad óptica se presenta como un porcentaje del control (% C), a cuya densidad se le asignó un valor arbitrario de 100%. Como control de carga se realizó la detección de beta tubulina ( $\beta$ -tub) con un anticuerpo monoclonal. Los datos representan las media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  **Panel D: Relación p-CREB/CREB calculado a partir de los análisis densitométricos.** Los valores se presentan en relación al valor del grupo control, a cuya relación p-CREB/CREB se le asignó un valor arbitrario de 1. Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ .**

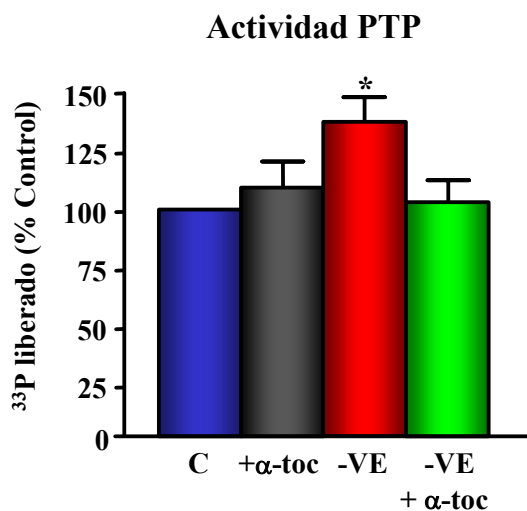


ello, el siguiente objetivo fue analizar los niveles de CREB y p-CREB mediante inmunoblot en extractos de hipocampo de rata en condiciones de deficiencia de VE y/o tras el tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol. Los resultados demuestran que el tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol aumenta tanto los niveles de CREB como la fosforilación del mismo (Figura 71), lo que indica que, en este grupo, la vía del AMPc/PKA/CREB está aumentada. Por el contrario, no se hallaron diferencias significativas en el resto de los grupos experimentales respecto al grupo control.

## B.5. EFECTOS DE LA VITAMINA E SOBRE LA VÍA DE LAS FOSFOTIROSINA FOSFATASAS

### B.5.1. Actividad fosfotirosina fosfatasa

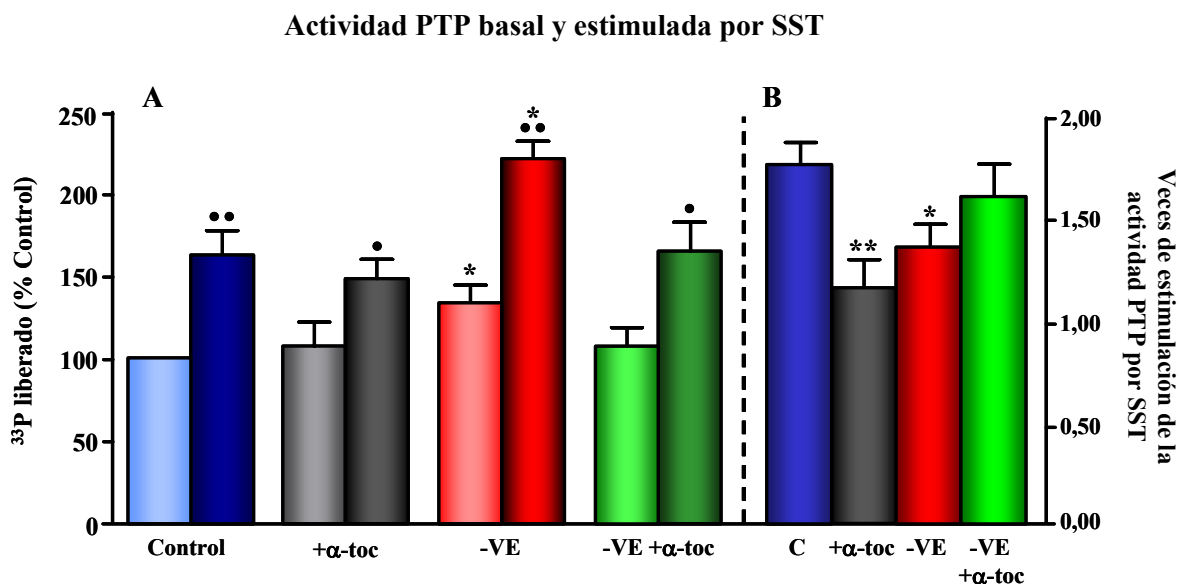
Se ha demostrado que una gran parte de los efectos inhibitorios de la SST sobre la proliferación celular se producen a través de la vía de las PTP. Estas enzimas son capaces de defosforilar numerosas proteínas y participar así en la regulación de procesos tales como el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis (Florio, 2008b). Se sabe que los SSTR se acoplan positivamente a las PTP a través de las proteínas Gi (Colás y col., 1992; Zeggari y col., 1994) y hemos comprobado que la VE altera tanto los SSTR como las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G. Por consiguiente, en este apartado se valoró el efecto de la VE sobre la actividad de las PTP. Para ello, se midió la actividad PTP en membranas de hipocampo de rata procedentes de los cuatro grupos experimentales. Como puede verse en la Figura 72, la deficiencia de VE aumentó significativamente la actividad PTP basal, que retornó al valor control tras una semana de tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol; sin embargo, no se detectaron



**Figura 72: Actividad fosfotirosina fosfatasa (PTP) basal en membranas de hipocampo** de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (+ $\alpha$ -toc) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VE (-VE) (■, n=5) y ratas deficitarias en VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (-VE+ $\alpha$ -toc) (■, n=5). Las membranas (0,5 mg/ml) se incubaron con  $^{33}\text{P}$ -poly(Glu:Tyr) (1 $\mu\text{M}$ ) durante 10 minutos y, posteriormente, se cuantificó el  $^{33}\text{P}$  liberado. Los datos se presentan como un porcentaje del grupo control, a cuya cantidad de  $^{33}\text{P}$  liberado se le asignó un valor arbitrario de 100%. Los datos representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: \* p<0,05.

cambios significativos en dicha actividad en el grupo de ratas control tratadas con  $\alpha$ -tocoferol.

Anteriormente, demostramos un aumento del número de SST en el grupo de ratas alimentadas con un pienso sin VE. En base a estos resultados, se decidió explorar la capacidad de la SST para estimular las PTP. Para ello, se procedió a estimular dicha actividad *in vitro* conforme se ha explicado en la sección de **Materiales y métodos**. Los resultados demuestran que aunque la actividad basal y estimulada por SST de las PTP es mayor en el grupo de ratas alimentado sin VE, la capacidad de la SST para estimular las PTP está disminuida en este grupo con respecto al grupo de ratas control (**Figura 73**). El tratamiento de estas ratas con  $\alpha$ -tocoferol revirtió estos parámetros al valor control. Este



**Figura 73. Panel A: Actividad fosfotirosina fosfatasa (PTP) basal (barras claras) y estimulada por somatostatina (SST) (barras oscuras) en membranas de hipocampo de ratas control (■, n=5), ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (+ $\alpha$ -toc) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso deficitario en vitamina E (-VE) (■, n=5) y ratas deficitarias en VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (-VE+ $\alpha$ -toc) (■, n=5). Las membranas (0,5 mg/ml) se incubaron con BSA o SST ( $10^{-4}$  M) y, posteriormente, con  $^{33}\text{P}$ -poly(Glu:Tyr) ( $1\mu\text{M}$ ) durante 10 minutos. A continuación se determinó la cantidad de  $^{33}\text{P}$  liberado. Los datos se presentan como un porcentaje de la actividad basal del grupo control, a cuya cantidad de  $^{33}\text{P}$  liberado se le asignó un valor arbitrario de 100%. Los datos representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes realizados por duplicado. Comparación estadística actividad basal vs. actividad estimulada por SST: •  $p < 0,05$  ••  $p < 0,01$ . Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ . **Panel B: Relación entre la actividad estimulada por SST y la actividad basal en membranas de hipocampo de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (+ $\alpha$ -toc) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso deficitario en vitamina E (-VE) (■, n=5) y ratas deficitarias en VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (-VE+ $\alpha$ -toc) (■, n=5). Comparación estadística frente al control: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .****

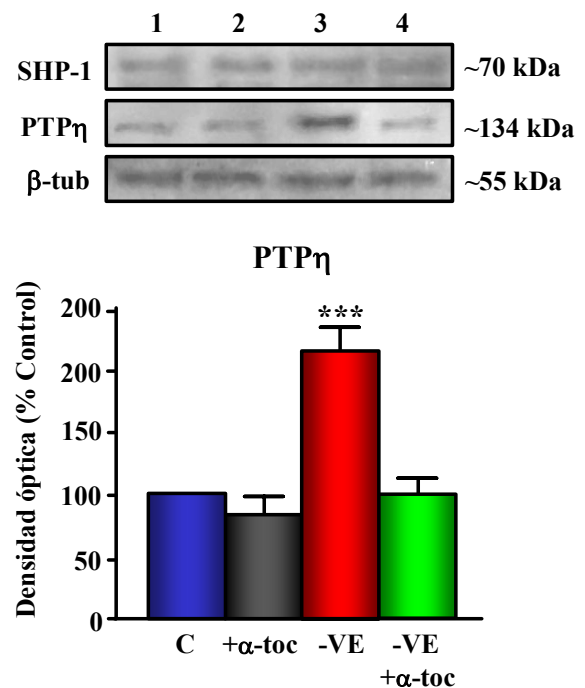


mismo tratamiento en ratas control no varió las actividades basal y estimulada por SST de las PTP, pero disminuyó significativamente la capacidad de la SST para estimular la actividad PTP (Figura 73).

### **B.5.2. Expresión proteica de SHP1 y PTP $\eta$**

A la vista del aumento en la actividad PTP observado en las ratas con deficiencia de VE, se planteó la posibilidad de que dicha deficiencia estuviera aumentando la expresión de alguna PTP en el hipocampo. Para probar esta hipótesis, analizamos, mediante inmunoblot, los niveles de dos PTP: la SHP1 y la PTP $\eta$ . La SHP1 se escogió para el estudio por ser una PTP de tipo no-transmembrana (Valencia y col., 1997), por estar ampliamente expresada en el hipocampo (Horvat y col., 2001) y por estar positivamente acoplada a la vía de la SST, mediando sus efectos antiproliferativos (Raully y col., 1996; Reardon y col., 1997; Zapata y col., 2002). Por otro lado, se escogió la PTP $\eta$  no sólo por encontrarse también positivamente

**Figura 74. Panel superior: Autorradiografías derivadas de los inmunoblots de SHP-1 y PTP $\eta$  en hipocampo de rata.** El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (n=5), el carril 3 a ratas alimentadas con un pienso sin VE (n=5) y el carril 4 a ratas alimentadas con un pienso sin VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Como control de carga se utilizó la  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -tub), detectada mediante un anticuerpo monoclonal. **Panel inferior: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de PTP $\eta$  presente en el hipocampo de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (+ $\alpha$ -toc) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso sin VE (-VE) (■, n=5) y ratas deficitarias en VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (-VE+ $\alpha$ -toc) (■, n=5). Las densidades ópticas se presentan como un porcentaje del control, a cuya densidad, una vez normalizada con la  $\beta$ -tub, se le asignó un valor arbitrario de 100%. Los datos representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*\*\* p<0,001.**

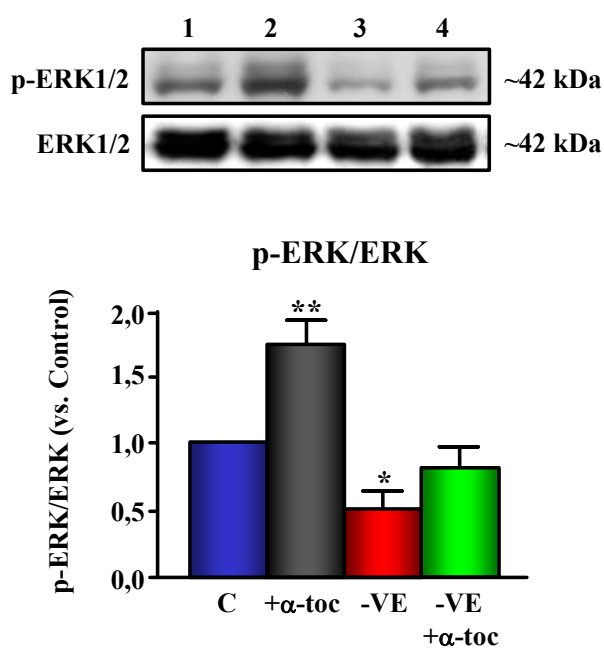


acoplada a la SST y por estar expresada ubicuamente en el SNC (Florio y col., 2000, Florio, 2008b), sino también por sus efectos antiproliferativos (Ostman et al., 2006) y por ser una PTP de tipo transmembrana (Tonks, 2006).

La Figura 74 muestra que la deficiencia de VE aumenta significativamente los niveles de la PTP $\eta$  en membranas de hipocampo de rata, que revierten al valor control tras una semana de tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol; este mismo tratamiento en ratas control no tuvo ningún efecto significativo sobre los niveles de PTP $\eta$ . Por otro lado, los niveles de SHP-1 fueron similares en todos los grupos experimentales analizados.

### B.5.3. Fosforilación de ERK

Dado que las PTP pueden desfosforilar a ERK1/2, que está implicada en procesos de supervivencia, proliferación y diferenciación celular (Davie y Spencer, 2001; MacDonald y col, 1993) y a la vista del aumento observado tanto en la actividad PTP como en la expresión de PTP $\eta$  en las ratas deficientes en VE, el siguiente objetivo fue analizar la fosforilación de ERK1/2, ya que una alteración a este nivel podría interferir con la supervivencia neuronal en estas condiciones experimentales. Para ello, se realizó un ensayo de inmunoblot con



**Figura 75. Panel superior:** Autorradiografías derivadas de los inmunoblots de ERK1/2 fosforilado (p-ERK1/2) y ERK total (ERK1/2) en hipocampo de rata. El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (n=5), el carril 3 a ratas alimentadas con un pienso sin VE (n=5) y el carril 4 a ratas alimentadas con un pienso sin VE y tratadas posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. **Panel inferior:** Relación entre la densidad de las bandas de p-ERK1/2 y sus correspondientes bandas de ERK1/2 presentes en extracto de hipocampo de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con  $\alpha$ -toc (+ $\alpha$ -toc) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso deficitario en VE (-VE) (■, n=5) y ratas deficitarias en VE tratadas con  $\alpha$ -tocoferol (-VE+ $\alpha$ toc) (■, n=5). Las densidades ópticas se presentan como porcentajes del control, a cuya relación p-ERK/ERK se le asignó un valor arbitrario de 1. Los datos representan la media  $\pm$  E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \* p<0,05; \*\* p<0,01.





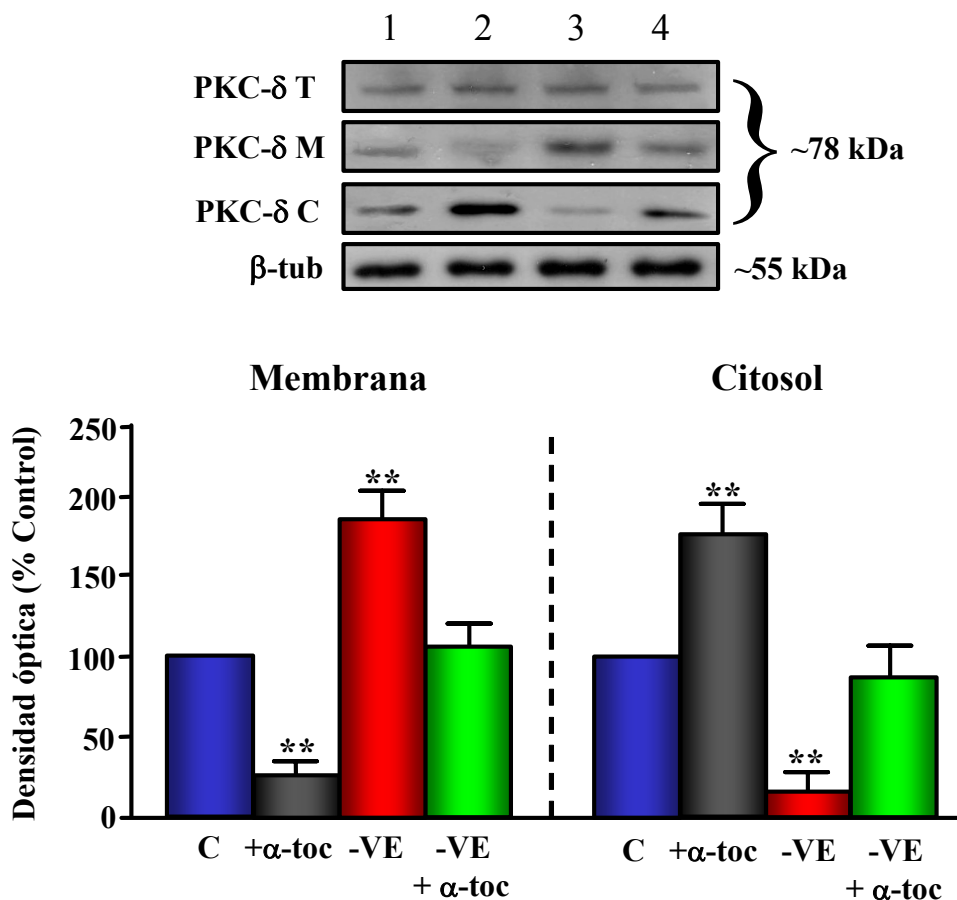
anticuerpos específicos anti-ERK1/2 fosforilado (p-ERK) y anti-ERK1/2 total en extractos de hipocampo de rata. Como se muestra en la [Figura 75](#), la deficiencia de VE provocó una disminución significativa en la fosforilación de ERK, que revirtió al valor control tras una semana de tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol mientras que, en las ratas control, este tratamiento aumentó significativamente los niveles de p-ERK.

## B.6. EFECTOS DE LA VITAMINA E SOBRE LA PROTEINA QUINASA C- $\delta$

Como se ha descrito en la [Introducción](#), la PKC es una quinasa citosólica implicada en la regulación de la diferenciación celular y la neurogénesis, entre otros procesos (Dekker y Parker, 1997; Oehrlein y col., 1998). Un estudio reciente ha demostrado que el  $\alpha$ -tocoferol inhibe la activación de la PKC (Ferri y col., 2006). Además, se sabe que la PKC tiene la capacidad de fosforilar y activar, entre otras enzimas, a las PTP (Tracy y col., 1995) y a GRK2 (Chuang y col., 1995; Krasel y col., 2001). A la vista de las alteraciones en estas dos enzimas descritas en apartados anteriores, se consideró importante comprobar el efecto de la deficiencia de VE sobre la activación de la PKC para valorar su posible implicación en dichos cambios.

Dado que el tratamiento de las muestras para otros análisis bioquímicos realizados en este estudio (p.ej. la valoración de la actividad PTP) no permitía el uso de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , haciendo así inviable medir la PKC fosforilada, se realizó una aproximación basándose en el hecho de que la PKC, una vez fosforilada o activada en el citosol, puede unirse a las membranas de la célula, donde realiza muchas de sus funciones (Tracy y col., 1995; Oehrlein y col., 1998; Ferri y col., 2006). Por lo tanto, para realizar este ensayo, se midieron los niveles de la enzima en muestras de citosol, membranas y extracto total de hipocampo de rata mediante inmunoblot con anticuerpos específicos anti-PKC- $\delta$ . Se eligió analizar esta isoforma porque se ha descrito que fosforila a las PTP (Steták y col., 2001) y es inhibida por  $\alpha$ -tocoferol (Ferri y col., 2006). Los resultados de este análisis se muestran en la [Figura 76](#). Se observa que, si bien la deficiencia de VE no modifica la expresión proteica de la PKC- $\delta$ , sí que incrementa su presencia en la membrana plasmática y disminuye su densidad en el citosol, un efecto que revierte tras una semana de tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol. Por otro lado, en el grupo de ratas control tratadas durante una semana con  $\alpha$ -tocoferol, se observa el efecto contrario, es decir, una mayor presencia de PKC- $\delta$  en el citosol y una disminución de ésta en las membranas.



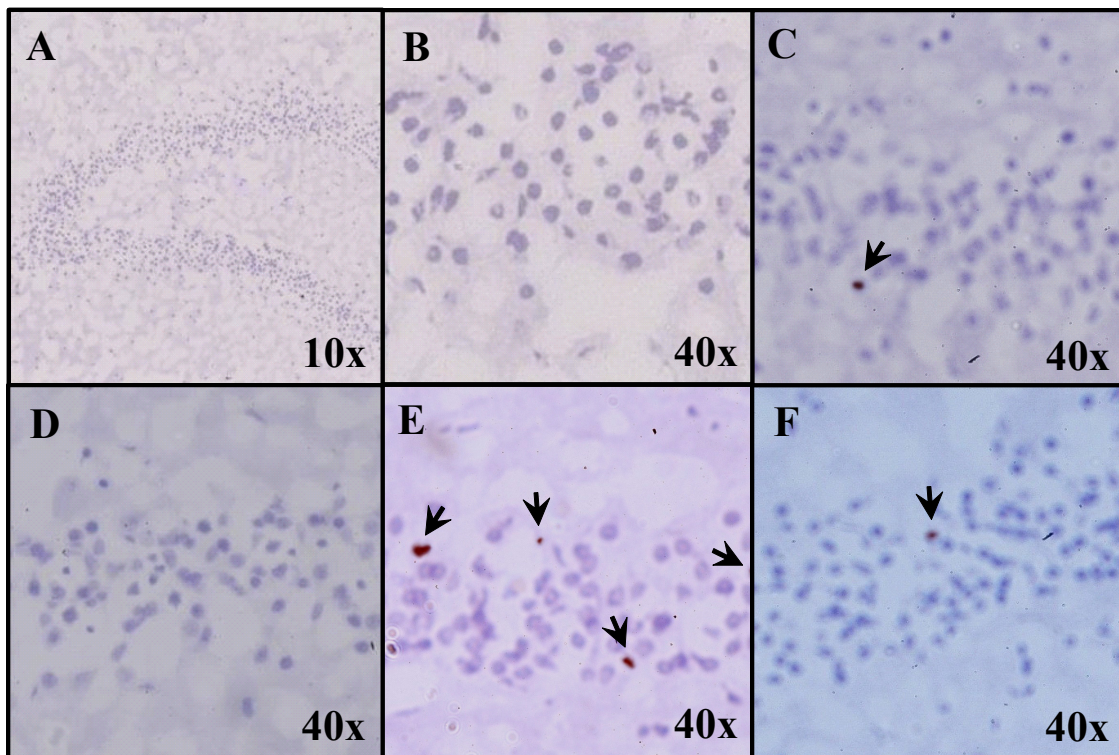


**Figura 76. Panel superior:** Autorradiografías derivadas de los inmunoblots de PKC-δ en extracto total (PKC-δ T), membranas (PKC-δ M) y citosol (PKC-δ C) de hipocampo de rata. El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con α-tocoferol (n=5), el carril 3 a ratas alimentadas con un pienso sin VE (n=5) y el carril 4 a ratas alimentadas con un pienso sin VE y tratadas posteriormente con α-tocoferol (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. También se muestra un control de carga realizado con β-tubulina (β-tub), detectada con un anticuerpo monoclonal. **Panel inferior:** Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de PKC-δ presente en membranas y citosol de hipocampo de ratas control (C) (■, n=5), ratas tratadas con α-tocoferol (+α-toc) (■, n=5), ratas alimentadas con un pienso deficitario en VE (-VE) (■, n=5) y ratas deficitarias en VE tratadas con α-tocoferol (-VE+α-toc) (■, n=5). Las densidades ópticas se presentan como porcentajes sobre el control, a cuya densidad se le asignó un valor arbitrario de 100. Los datos representan las media ± E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: \*\* p<0,01.



## **B.7. EFECTOS DE LA VITAMINA E SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR**

Los resultados anteriores muestran cambios en la fosforilación y actividad de enzimas implicadas en la supervivencia y la muerte celular. A la vista de estos resultados, nos pareció interesante valorar si el aumento en la actividad PTP y la disminución en la fosforilación de ERK en las ratas alimentadas sin VE podrían conducir a un aumento en la muerte neuronal. Para evaluar esta hipótesis, se realizó una tinción *in situ* de núcleos apoptóticos de hipocampo mediante la técnica del TUNEL y, posteriormente, se evaluaron los cortes al microscopio óptico. Como puede verse en la [Figura 77](#), las ratas alimentadas con un pienso deficitario en VE presentan un mayor número de células TUNEL(+) con respecto al grupo control. El tratamiento de estas ratas con  $\alpha$ -tocoferol revirtió esta alteración al valor control.



**Figura 77:** Tinción TUNEL de cortes histológicos de hipocampo. **A:** Control negativo de la tinción, región del giro dentado (GD). **B:** Control negativo de la tinción, detalle de los núcleos del GD contrastados con hematoxilina. **C:** Grupo Control. **D:** Grupo control tratado con  $\alpha$ -tocoferol. **E:** Grupo alimentado con un pienso sin VE. **F:** Grupo alimentado con un pienso sin VE y tratado posteriormente con  $\alpha$ -tocoferol. Las flechas señalan los núcleos TUNEL-positivos. Se muestra una fotografía representativa de cinco tinciones independientes.

## *Discusión*

“Y, sin embargo, se mueve”.  
[Galileo Galilei]



## **DISCUSIÓN**

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación demuestran, por primera vez, que tanto la VA como la VE no sólo ejercen efectos antioxidantes sino que también son capaces de regular, *in vivo*, el sistema somatostatinérgico en el hipocampo de la rata adulta, lo que sugiere que este sistema puede estar implicado en el mecanismo de acción mediante el cual dichas vitaminas regulan la supervivencia celular y las funciones cognitivas.

En este estudio se han usado dos modelos de inducción de deficiencia vitamínica ya establecidos por otros grupos de investigación. En el caso de la VA, se escogió un modelo de 12 semanas de privación puesto que, a ese tiempo, es cuando aparecen los primeros síntomas clínicos de deficiencia de VA (Oliveros y col., 2000; Cocco y col., 2002). En nuestro caso, estos síntomas incluyeron pérdida de peso, conjuntivitis y sequedad corneal<sup>9</sup>. El análisis de los niveles de retinol en plasma e hígado de ratas control coinciden con los publicados por el grupo de Oliveros (Oliveros y col., 2000) y el de Cocco (Cocco y col., 2002). Por otro lado, hemos demostrado que el pienso sin VA conduce a una reducción significativa de los niveles de esta vitamina en el hipocampo, como muestra la reducción en la concentración de retinol detectada en esta área cerebral.

El tratamiento de las ratas con VA se realizó de acuerdo con el protocolo modificado de Husson y col. (2004), con inyecciones diarias de TTR por vía i.p. En estudios preliminares, se empleó un pienso suplementado en TTR (4500 µg TTR/kg dieta); el problema de esta estrategia es que no todas las ratas ingerían la misma cantidad diaria de alimento y, por tanto, la variación estadística del grupo alimentado con este pienso era muy elevada. La elección de TTR se basó en que el ATTR, a pesar de ser la forma activa de la VA, no puede ser reducido a retinol, ya que el paso de retinal a ATTR es irreversible (Bellovino y col., 2003; Debier y Larondelle, 2005). Por lo tanto, si alguna de las acciones de la VA sobre los parámetros medidos en el presente trabajo estuvieran mediadas por el retinol o por el retinal, no se detectarían mediante la administración de ATTR. Existen otros modelos experimentales para analizar los efectos de la VA basados en el bloqueo de los RNR mediante antagonistas específicos, como el AGN193109 o el CD2665 (Alfos y col., 2001; Beard y col., 2001). No obstante, no hemos considerado su utilización en este trabajo ya que

---

<sup>9</sup> La valoración clínica de los síntomas asociados a la deficiencia de VA la realizó el veterinario a cargo del Centro de Experimentación Animal de esta Universidad.



dichos antagonistas no bloquean todos los subtipos de RNR y, además, porque su uso no bloquea la vía citosólica de acción de la VA, al ser ésta una vía independiente de receptor.

Para el estudio de la VE, se escogió un modelo de privación de 9 semanas basado en un modelo propuesto por Fukui y col. (2001), ya que, a ese tiempo, los niveles de VE en los tejidos periféricos y en sangre circulante son ya significativamente menores que en el grupo control. El análisis de los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en plasma e hígado de ratas control son coherentes con los publicados por otros autores (Cuppini y col., 2001; Franco-Mdo y col., 2003). Además, hemos demostrado que tras 9 semanas de privación de VE, los niveles de esta vitamina en el hipocampo también están afectados, como prueba la disminución significativa de los niveles de  $\alpha$ -tocoferol.

El tratamiento de las ratas con VE se realizó de acuerdo con el protocolo de Socci y col. (1995). A pesar de que el aceite de soja utilizado como vehículo contiene tocoferoles, éstos son principalmente  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol (Player y col., 2006), que se excretan a través de la bilis y se eliminan del organismo. Se escogió, además, el  $\alpha$ -tocoferol en lugar de otra forma de VE para tratar las ratas dado que, en condiciones fisiológicas, el metabolismo del organismo permite retener selectivamente el  $\alpha$ -tocoferol que, por tanto, representa la forma mayoritaria de VE en los tejidos (Hosomi et al, 1997; Stahl et al, 2002).

Numerosos autores han observado que tanto la deficiencia de VA (Cocco y col., 2002; Etchamendy y col., 2003) como la deficiencia de VE (Ichitani y col., 1992; Fukui y col., 2001; Morris y col., 2002) generan trastornos en los procesos de aprendizaje y memoria. Por ello, centramos nuestro estudio en el hipocampo, ya que esta formación parece actuar como un almacén temporal de experiencias sensoriales y resulta fundamental en la formación de nuevos recuerdos. Además, esta área cerebral es rica tanto en neuronas somatostatinérgicas como en SSTR, que predominan en las regiones CA1 y CA2 (Csaba y Dournaud, 2001), y en ella se registran multitud de procesos de plasticidad sináptica, considerados como la base celular del aprendizaje y la memoria (Giap y col., 2000; Shapiro, 2001; Kandel, 2005; Amaral y col., 2007), en los que la SST está implicada (Guillou y col., 1998; Baratta y col., 2002).



## 1. VITAMINA A

En este trabajo se demuestra que la deficiencia de VA produce trastornos en diferentes componentes de la vía de señalización de la SST en el hipocampo de la rata adulta y que la administración de TTR durante una semana a estas ratas privadas de VA revierte parcialmente dichos trastornos.

El contenido de SST-IR en el hipocampo de las ratas control fue similar al descrito previamente por nuestro grupo (Puebla y Arilla-Ferreiro, 2003; Izquierdo-Claros y col., 2004) y por otros autores (Patel y Reichlin, 1978). En las ratas alimentadas con un pienso sin VA durante 12 semanas, se detectó una disminución significativa en los niveles de SST-IR en el hipocampo, que revirtió a los valores control tras una semana de tratamiento con inyecciones diarias de TTR (150 µg/kg peso). Cañón y col. (2004) comprobaron que el AR induce un aumento en la fosforilación de CREB en células PC12 y en cultivos primarios de células corticales de rata. Dado que el promotor del gen de la SST contiene un CRE, que resulta esencial en la regulación de la transcripción mediada por el AMPc (Montminy y Bilezikian, 1987; Andrisani y Dixon, 1990; Montminy y col., 1996), y la deficiencia de VA indujo una disminución en la fosforilación de CREB, sería razonable pensar que el menor contenido de SST-IR en las ratas deficitarias de VA podría estar relacionado con una alteración en la transcripción del gen. Sin embargo, el hecho de que los niveles de ARNm de la prepro-SST en el hipocampo de las ratas deficitarias en VA fueran similares a los del grupo control permite descartar esta posibilidad. Este hallazgo está en consonancia con trabajos previos que muestran que el AR no modifica directamente la expresión del gen de la SST en células PC12 transfectadas con el promotor del gen de la SST (Liu y col., 1994). La falta de correlación entre el contenido de SST-IR y los niveles de ARNm de la prepro-SST podría, por lo tanto, ser consecuencia de modificaciones post-traduccionales, de un aumento en la tasa de degradación del péptido o de un aumento en la tasa de liberación del péptido por encima del nivel de síntesis. Existen dos endoproteasas de la superfamilia de las PC, llamadas PC1/PC3 y PC2, que están directamente implicadas en el procesamiento post-traduccionales de la pro-SST. La PC2, en concreto, está ampliamente expresada en los CA del hipocampo y, de forma moderada, en el GD (Patel y Galanopoulou, 1995; Winsky-Sommerer y col., 2003; Shen y col., 2005). El estudio de la expresión de PC2 en el hipocampo mostró una disminución significativa en los niveles de dicha enzima en aquellas ratas que fueron privadas de VA. Por consiguiente, esta disminución podría conducir a un menor

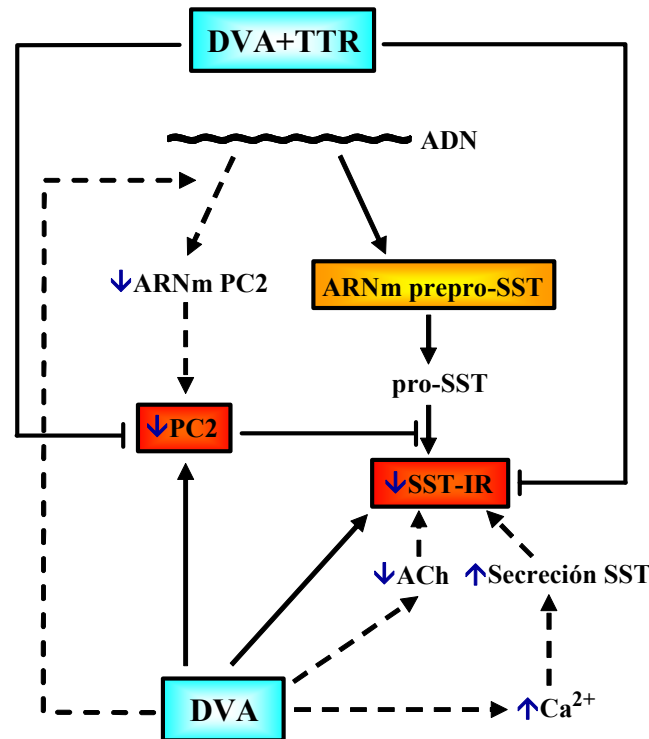


procesamiento de la pro-SST, que se reflejaría en una reducción de los niveles de SST-IR. En este sentido, se ha observado que en los islotes pancreáticos de ratones transgénicos que no expresan dicha endoproteasa (ratones PC2  $-/-$ ), el procesamiento de la pro-SST está severamente disminuido (Furuta y col., 1997). Por otro lado, se ha demostrado que el promotor del gen que codifica para la PC2 contiene elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE, por sus siglas en inglés) a los que se une un RXR que activa su transcripción. Se ha comprobado que cuando dicho promotor se transfecta en células hipofisarias GH-3, éste se estimula por el A9CR y se inhibe en ausencia del retinoide (Shen y col., 2005). En su conjunto, todos estos resultados apoyan la hipótesis de que la deficiencia de VA altera la maduración de la pro-SST, generando así una disminución en los niveles de SST (Figura 78).

Por otra parte, se ha observado que en el cerebro de ratas con deficiencia de VA, se produce una acumulación progresiva de  $Ca^{2+}$  (Rahman y col., 1996). De los Frailes y col. (1990) demostraron que un aumento de  $Ca^{2+}$  en células corticales en cultivo puede desencadenar la liberación de la SST de los almacenes intracelulares. Por lo tanto, este efecto podría contribuir, junto con el trastorno en la maduración de la pro-SST descrito anteriormente, a la disminución del contenido de SST-IR observada en el hipocampo de las ratas alimentadas con un pienso sin VA (Figura 78).

Alternativamente, la reducción del contenido de SST-IR en el hipocampo podría ser secundaria al daño que la deficiencia de VA produce en la neurotransmisión colinérgica (Cocco y col., 2002). Baghdoyan y col. (1998), por ejemplo, observaron una reducción en la liberación de acetilcolina estimulada por escopolamina en ratas alimentadas con un pienso sin VA. Se sabe que existe una estrecha relación entre los sistemas somatostatinérgico y colinérgico en el hipocampo de mamíferos, como evidencian los estudios electrofisiológicos (Mancillas y col., 1986; Matsuoka y col., 1991), neuroquímicos (Araújo y col., 1990; Barrios y col., 1990; Gaykema y col., 1991; van der Zee y col., 1991; Álvaro y Arilla, 1992) y de conducta (Haroutunian y col., 1989; Ohno y col., 1993). En el hipocampo de la rata, por ejemplo, las terminaciones colinérgicas realizan sinapsis con células que contienen SST (Leranth y Frotscher, 1987). Además, se ha descrito que la infusión i.c.v. de IgG-192-saporina, una inmunotoxina específica de células colinérgicas, conduce a una reducción significativa en el contenido de SST en la corteza y el hipocampo, que se correlaciona con una disminución en la actividad acetyl-colintransferasa (Nag y Tang, 1998). Estos resultados concuerdan con los de Zhang y col. (1998), quienes comprobaron que una lesión selectiva





**Figura 78:** Resumen de los efectos de la deficiencia de vitamina A (DVA) sobre el contenido de somatostatina inmunorreactiva (SST-IR). Los recuadros indican los parámetros medidos en este estudio. En rojo se destacan los valores que disminuyen respecto al control y en naranja los que no varían. Las flechas sólidas indican los efectos estudiados en este trabajo y las flechas discontinuas indican los efectos analizados por otros autores. ACh: acetilcolina; PC2: prohormona convertasa 2; TTR: todo-*trans*-retinol.

del prosencéfalo basal colinérgico conduce a una pérdida de neuronas somatostatinérgicas. En base a todos estos estudios, es tentador especular que la reducción de acetilcolina que se produce por una deficiencia de VA (Cocco y col., 2002) podría también explicar, al menos en parte, la disminución en el contenido de SST-IR observado en nuestro estudio.

Los parámetros de unión de la SST a sus receptores en el hipocampo de las ratas control son similares a los descritos previamente por nuestro grupo y otros autores (Srikant y Patel, 1981; Epelbaum y col., 1982; Aguado-Llera y col., 2005; Hervás-Aguilar y col., 2005). En este trabajo, la disminución detectada en los niveles de SST-IR en el grupo de ratas alimentadas con un pienso sin VA se acompañó de un incremento significativo en la unión del  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST-14}$  a sus receptores. Los valores estequiométricos obtenidos tras el análisis de Scatchard revelaron que esta mayor unión se debe a un incremento del número de receptores de SST. Hay que destacar que varios estudios *in vivo* han demostrado una





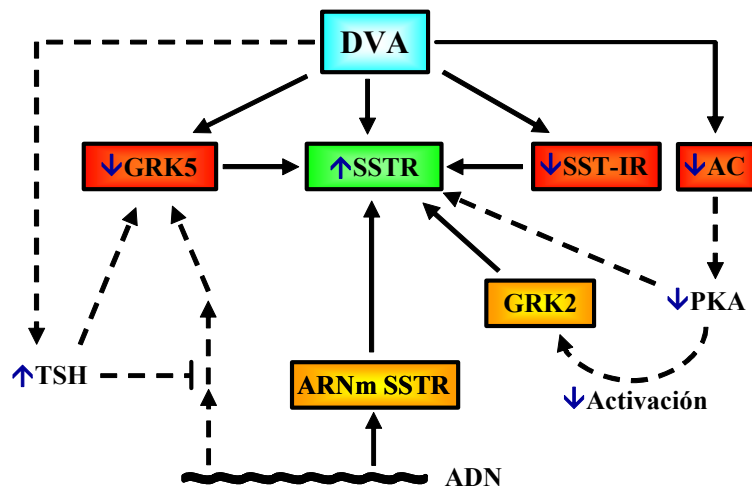
regulación al alza del número de SSTR en el cerebro de ratones deficientes en SST (Ramírez et al., 2002) y en el cerebro de ratas tras una depleción química de la SST con cisteamina (Srikant y Patel, 1984). Nuestro grupo de investigación también demostró previamente un aumento en la unión de la SST a sus receptores que se produce en paralelo a una reducción de SST-IR en la mucosa gástrica y duodenal de ratas tratadas con cisteamina (González-Guijarro y col., 1986).

Con el fin de profundizar en el mecanismo molecular implicado en la regulación al alza de los SSTR, se estudió la expresión de los distintos subtipos de receptores. Los resultados obtenidos demuestran un aumento en los niveles proteicos de SSTR1, SSTR2, SSTR3 y SSTR4, que concuerda con los datos de unión; sin embargo, no se encontraron cambios en los respectivos niveles de ARNm. Este hallazgo permite afirmar que el mayor número de SSTR no es consecuencia de un aumento en la tasa de transcripción génica. Dado que el número de receptores presentes en la superficie celular está en función de los procesos combinados de inserción de receptores recién sintetizados en la membrana plasmática y de la tasa de internación de los mismos, un mecanismo posible sería una alteración en la desensibilización o internación de los SSTR. En este sentido, se sabe que los SSTR, al igual que otros GPCR, sufren una endocitosis dependiente de clatrina después de ser activados por la unión con su agonista (Hipkin y col., 2000; Gainetdinov y col., 2004; Kelly y col., 2008). La fosforilación de los receptores por determinadas quinasas, como la PKA o las GRK, es la señal química para que se inicie este proceso (Hipkin y col., 2000; Erdtmann-Vourtlitotis y col., 2001; Oomen y col., 2001; Gainetdinov y col., 2004; Kelly y col., 2008). De las siete isoformas de GRK caracterizadas hasta la fecha, la GRK1 y la GRK7 se expresan casi exclusivamente en retina mientras que la GRK2, GRK3, GRK5 y GRK6 se expresan de forma ubicua, incluyendo el cerebro, sugiriendo un papel importante de estas enzimas en la transducción de señales en neuronas (Kohout y Lefkowitz, 2003). En este trabajo, se ha demostrado que la deficiencia de VA provoca una disminución significativa en los niveles de GRK5, sin cambios significativos en GRK2 o GRK6, en membranas de hipocampo de rata. GRK5 es una proteína de membrana que se encuentra ampliamente expresada en el cerebro de la rata y que fosforila los GPCR en el dominio C-terminal intracelular (Erdtmann-Vourtlitotis y col., 2001). Se ha descrito que la expresión de GRK5 disminuye en respuesta a la TSH (Nagayama y col., 1996) y que la secreción de esta hormona aumenta en condiciones de deficiencia de VA (Morley y col., 1980; Zimmermann y col., 2004). Por lo tanto, cabe la



posibilidad de que las ratas alimentadas con un pienso libre de VA, al tener niveles aumentados de TSH, tengan inhibida la expresión de GRK5 en el hipocampo, lo cual explicaría el descenso de esta proteína encontrado en dichas ratas (Figura 79). A su vez, la menor disponibilidad de GRK5 en la membrana plasmática podría conducir a una disminución en la interacción SSTR-GRK5 y, por tanto, al aumento de los SSTR. En apoyo de esta hipótesis, el tratamiento de las ratas deficitarias en VA con TTR durante una semana revirtió tanto los niveles proteicos de SSTR1, SSTR3 y SSTR4 como los de GRK5 a los valores control.

Por otro lado, se sabe que la PKA también es capaz de fosforilar distintos GPCR y provocar su internación (Clark y col., 1988; Kelly, 2008). Además, se ha descrito recientemente que la PKA puede fosforilar directamente la GRK2 en la serina 685, lo que conduce a su activación (Cong y col., 2001; Li y col., 2006). Aunque no encontramos cambios en la expresión proteica de la GRK2 entre los distintos grupos experimentales analizados, sí que encontramos un descenso en la actividad AC basal y estimulada en el grupo de ratas alimentadas con un pienso sin VA. Dicho descenso podría conducir a una menor activación de la PKA y, de este modo, a una disminución en la capacidad de la GRK2 para fosforilar los SSTR, reduciendo así su internación (Figura 79). Serán necesarios estudios



**Figura 79:** Resumen de los efectos de la deficiencia de vitamina A (DVA) sobre los receptores de somatostatina (SSTR). Los recuadros indican los parámetros medidos en este trabajo. En rojo se destacan los valores que disminuyen respecto al control, en naranja los que no varían y en verde los que aumentan. Las flechas sólidas indican los efectos estudiados en este trabajo y las flechas discontinuas indican los efectos analizados por otros autores. AC: adenilato ciclasa; GRK: quinasa de los receptores acoplados a proteínas G; PKA: proteína quinasa A; SST-IR: somatostatina inmunorreactiva; TSH: tirotropina.



adicionales para valorar en profundidad la actividad de estas quinasas y así poder evaluar la relevancia de esta vía.

Éste es el primer trabajo que muestra una regulación diferencial de las GRK en condiciones de deficiencia vitamínica. Hay que resaltar que existen diferencias notables entre las distintas isoformas de GRK en mamíferos. Así, mientras que la GRK2 y la GRK3 fosforilan preferentemente residuos de serina y treonina presentes en el lado C-terminal de aminoácidos básicos, la GRK5 y la GRK6 no muestran tal preferencia. Además, la GRK5 se autofosforila, lo que probablemente conduce a su activación, mientras que no se ha descrito una autofosforilación de la GRK2, la GRK3 o la GRK6. El efecto de la deficiencia de VA sobre la GRK5 observado en este trabajo podría tener otras consecuencias fisiológicas importantes ya que estudios recientes han puesto de manifiesto que aunque las GRK fosforilan preferentemente los GPCR activados, también son capaces de fosforilar otros receptores de membrana, como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Hildreth y col., 2004), y sustratos no-receptores como la tubulina, sinucleínas y otros sustratos solubles (Penela y col., 2003; Cant y Pitcher, 2005). Además, se ha descrito que las GRK pueden también contribuir a modular respuestas celulares de una manera independiente de la fosforilación debido a su capacidad para interactuar con una variedad de proteínas implicadas en la señalización y tráfico celular, tales como  $G\alpha_q$ ,  $G\beta/\gamma$ , PI3K, clatrina, caveolina, la quinasa de Raf-MAPK/ERK (MEK), Akt/PKB y la proteína inhibidora de Raf (RKIP) (Penela y col., 2003; Cant y Pitcher, 2005; Liu y col., 2005).

Sorprendentemente, los niveles proteicos del subtipo SSTR2 permanecieron elevados después de la restitución de la VA, a diferencia de los niveles de SSTR1, SSTR3 o SSTR4, que volvieron a la normalidad. La administración de TTR a ratas control también provocó un aumento selectivo en la expresión proteica de dicho receptor. Aunque el mecanismo molecular implicado en estos efectos se desconoce, Hashemi y col. (2003) han demostrado que el tratamiento de células de neuroblastoma SH-SY5Y con ácido retinoico aumenta significativamente los niveles proteicos del subtipo SSTR2A en comparación con células cultivadas en ausencia del ácido. Además, Chen y col. (2008) encontraron que la VA, a través de un receptor RAR transmembrana recientemente descubierto, es capaz de modular la traducción y el traslado a la superficie celular de la subunidad 1 de los receptores AMPA sin producir cambios en otras subunidades. Por lo tanto, en el hipocampo de las ratas, el tratamiento con TTR podría conducir a un efecto similar, aumentando la traducción y el



traslado a la superficie del SSTR2 sin alterar el resto de las isoformas. Por otro lado, dado que el anticuerpo empleado en nuestro estudio no discrimina entre las dos isoformas de SSTR2 generados por procesamiento alternativo, el SSTR2A y SSTR2B, no se puede descartar la posibilidad de que los efectos del TTR sean selectivos para el SSTR2A y que el aumento detectado en las ratas con deficiencia de VA corresponda a SSTR2B.

En base a los hallazgos bioquímicos obtenidos a nivel de la SST y de sus receptores, el siguiente objetivo fue analizar la funcionalidad de los SSTR en condiciones de deficiencia de VA a través del estudio del efector AC. La concentración de SST requerida para producir inhibición de la actividad AC en membranas de hipocampo fue elevada ( $10^{-4}$  M). No obstante, esta concentración es similar a la utilizada por Schettini y col. (1989) y por Garlind y col. (1992) en sus respectivos estudios sobre la inhibición de la AC mediada por SST en cerebro humano y de rata. Dado que las neuronas y las células gliales presentan diferencias en sus respuestas a la SST, la heterogeneidad de las preparaciones de membranas usadas en estos estudios podría explicar la elevada concentración necesaria para provocar dicha inhibición, tanto por nuestro grupo como por otros autores (Garlind y col., 1992; Izquierdo-Claros y col., 2001). En el presente trabajo, se ha encontrado que la deficiencia de VA genera un descenso tanto en la actividad AC basal como en la actividad AC estimulada por FK, así como una disminución en la capacidad de la SST para inhibir dichas actividades. La reducción en la actividad AC no se puede atribuir a una alteración a nivel de la subunidad catalítica de la enzima ya que el número de veces de estimulación por forskolina fueron similares en todos los grupos experimentales analizados. Para intentar comprender mejor la causa de esta disminución, analizamos el contenido proteico de algunas de las isoformas de AC presentes en el hipocampo: la ACI y ACVIII, por su mayor expresión en cerebro, y la ACV/VI, por ser inhibidas por proteínas Gi (Sunahara y Taussig, 2002). El estudio de dicha expresión reveló que las ratas alimentadas con un pienso sin VA tenían bajos niveles de ACVIII en el hipocampo, que revirtieron al valor control tras el tratamiento con TTR. Al ser ésta una de las principales isoformas de AC en el cerebro, su menor expresión proteica podría explicar el descenso en la actividad AC detectado en este grupo de ratas. Aunque el significado fisiológico de estos hallazgos aún está por determinar, resulta interesante la reducción selectiva de ACVIII ya que varios estudios apuntan hacia un papel primordial de esta enzima en procesos de aprendizaje y memoria, funciones asociadas también a la SST (Zhang y col., 2008).



Por otro lado, se sabe que la ACV y ACVI se inhiben en presencia de concentraciones micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Sunahara y Taussig, 2002). Por lo tanto, aunque no hayamos detectado cambios en la expresión de estas dos isoformas de AC, el aumento progresivo de este catión descrito en el cerebro de ratas con deficiencia de VA (Rahman y col., 1996) podría inhibir la actividad de las dos enzimas y contribuir así al descenso de la actividad AC que hemos encontrado en las membranas de hipocampo derivadas de ratas deficientes en VA.

En todos los grupos experimentales analizados, la actividad AC basal y estimulada por FK fue inhibida por la SST. Sin embargo, este efecto inhibitorio de la SST fue significativamente menor en el hipocampo de las ratas alimentadas con una dieta libre de VA, a pesar de la regulación al alza de los SSTR detectado en este grupo. Se sabe que los SSTR se acoplan a la AC a través de proteínas Gi. Por lo tanto, estos resultados nos llevaron a pensar en una posible alteración a nivel de dichas proteínas. Los análisis mediante inmunoblot de las proteínas  $\text{Gi}\alpha 1$ ,  $\text{Gi}\alpha 2$  y  $\text{Gi}\alpha 3$  no revelaron cambios en el contenido proteico de estas subunidades en las ratas con deficiencia de VA con respecto al grupo control; sin embargo, el ensayo de la actividad de estas proteínas mediante su estimulación con Gpp(NH)p demostró un descenso significativo de actividad en dichas ratas. Se sabe que la transducción de señales por los GPCR depende, en gran medida, de la correcta formación de un heterotrímero  $\alpha$ - $\beta/\gamma$  en el tercer bucle intracelular de los GPCR de manera que, tras la activación del receptor por un agonista, se produce la disociación de la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta/\gamma$  (Gilman, 1987; Ford y col., 1998; Wall y col., 1998). Se ha demostrado, *in vitro*, que la CaM activada por  $\text{Ca}^{2+}$  es capaz de unirse a un dominio N-terminal de la subunidad  $\beta/\gamma$  e impedir, de este modo, la formación del heterotrímero, alterando la funcionalidad de las proteínas G (Liu y col., 1997). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido en las células cerebrales por la deficiencia de VA (Rahman y col., 1996) aumente la actividad de la CaM y ésta secuestre el dímero  $\beta/\gamma$ , impidiendo su asociación con la subunidad  $\alpha$ . De este modo, el acoplamiento negativo de los SSTR a la AC vía proteínas Gi quedaría interrumpido, lo que podría explicar, al menos en parte, la disminución en la capacidad de la SST para inhibir la actividad AC.

La vía AMPc/PKA/CREB es una cascada de señalización que juega un papel muy importante en los procesos de supervivencia celular y plasticidad neuronal (Finkbeiner, 2000;



Nakagawa y col., 2002; Saini y col., 2004). Estudios en diversos organismos, desde las babosas de mar del género *Aplysia* a mamíferos, indican que la ruta de activación de la proteína CREB forma parte esencial del interruptor molecular que convierte las memorias a corto plazo en memorias a largo plazo (Martin y col., 1997; Giap y col., 2000; Patterson y col., 2001; Barco y col., 2006). La proteína CREB es, en realidad, una familia constituida por dos factores de transcripción que son fosforilados por la PKA en residuos de serina. Esta fosforilación activa dichos factores y les permite unirse a regiones del ADN que contienen un CRE en su promotor (González y Montminy, 1989). En condiciones basales, las proteínas CREB se encuentran en su forma inactiva y pasan a su estado activo y fosforilado por interacción con distintas quinasas (Lonze y Ginty, 2002) en respuesta a factores como el estrés, mitógenos y señales excitadoras como el  $Ca^{2+}$ . Dado que la SST ha sido implicada en la regulación de la vía AMPc/PKA/CREB (Tentler y col., 1997), decidimos averiguar si la disminución en la actividad AC inducida por la deficiencia vitamínica se veía reflejada en alteraciones a nivel de la fosforilación de este factor de transcripción en neuronas de hipocampo. Los resultados demuestran una menor fosforilación de CREB en las ratas alimentadas sin VA. En conclusión, nuestros hallazgos indican que en el hipocampo de la rata adulta, la deficiencia de VA provoca una disminución en la expresión y actividad de la AC que conduce a una menor producción de AMPc. Esta reducción en los niveles de AMPc, a su vez, conduciría a una menor activación de la PKA y, por tanto, a la menor fosforilación de CREB. Todo ello sugiere que la alteración de la vía AMPc/PKA/CREB podría contribuir, al menos en parte, a los trastornos cognitivos descritos en ratas en condiciones de deficiencia de VA (Cocco y col., 2002; Etchamendy y col., 2003).

Otro importante efector de los SSTR son las PTP, enzimas que también juegan un papel importante en el hipocampo (Bernabéu y col., 2006; Horvat y col., 2001) y que median los efectos antiproliferativos y apoptóticos de la SST. Por lo tanto, una alteración en esta vía podría generar trastornos en la supervivencia neuronal que podrían explicar, parcialmente, los trastornos de aprendizaje y memoria asociados a la falta de VA. Se sabe que el ATTR induce la diferenciación de muchas líneas celulares y algunos autores postulan que las PTP pueden estar implicadas en este efecto (Uesugi y col., 2000; Calvert-Evers y Hammond, 2002), lo que sugiere una relación entre la VA y estas fosfatasa. Los resultados de nuestro trabajo sugieren que el mayor número de células TUNEL(+) detectado en las ratas alimentadas con un pienso sin VA no se deben a una alteración en la vía de las PTP.



Aunque se ha demostrado que en determinadas líneas celulares y tejidos la deficiencia de VA puede inducir un estado prooxidante (Gatica y col., 2005; Chiu y col., 2008), en el momento actual, están poco caracterizadas las alteraciones que ocurren en los sistemas de defensa antioxidantes en el hipocampo por una carencia de esta vitamina. Como se ha comentado en el capítulo 2 de la [Introducción](#), el SNC es especialmente susceptible a los radicales libres debido a la elevada cantidad de oxígeno que utiliza, a las bajas concentraciones de enzimas antioxidantes, al alto contenido en LPI y a las elevadas concentraciones de metales de transición redox-activos capaces de contribuir a la generación de ERO (Sayre y col, 2008). En este estudio demostramos que la deficiencia de VA aumenta el estrés oxidativo en el hipocampo de la rata adulta, como pone de manifiesto el aumento de la peroxidación de lípidos, la reducción de la ratio GSH/GSSG y la reducción en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT. Diversos trabajos han implicado al estrés oxidativo en alteraciones de determinadas moléculas de señalización celular. Li y col. (2008), por ejemplo, encontraron que la reducción en los niveles de las proteínas  $G_{i\alpha}$  y en la actividad AC inducida por altos niveles de glucosa en células musculares lisas vasculares podía atribuirse a un aumento del estrés oxidativo provocado por niveles altos de peroxinitrito. Asimismo, un estudio de Lappas y col. (2005) mostró la implicación del estrés oxidativo en el aumento de la expresión de proteínas  $G_{i\alpha}$  en ratas con hipertensión espontánea. Por otro lado, se observó que, en ratas Zucker obesas, un aumento del estrés oxidativo provoca un aumento tanto en la actividad PKC como en el traslado a la membrana de la GRK2, lo que, a su vez, conduce a la desensibilización del receptor dopaminérgico D1 (Banday y col., 2005). Por el contrario, en linfocitos, Lombardi y col. (2002) demostraron que el estrés oxidativo inducido por la exposición a peróxido de hidrógeno resulta en una reducción del 50% en los niveles proteicos de GRK2, sin cambios en el ARNm correspondiente. En base a todo ello, es posible que algunas de las alteraciones encontradas en el hipocampo de las ratas con deficiencia de VA, como la reducción del contenido de GRK5, de ACVIII, de p-CREB o incluso de la actividad funcional de las proteínas  $G_i$ , pueda atribuirse también a dicho estrés. Cuando estas ratas se trataron con TTR, el nivel de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, un indicador clásico de la peroxidación de lípidos, así como la actividad SOD retornaron a los valores control, lo que sugiere que dicho tratamiento redujo el estrés oxidativo; además, se normalizaron los niveles de GRK5 y de ACVIII, lo que apoya esta hipótesis. El hecho de que los niveles proteicos de SSTR1-4 no disminuyeran en





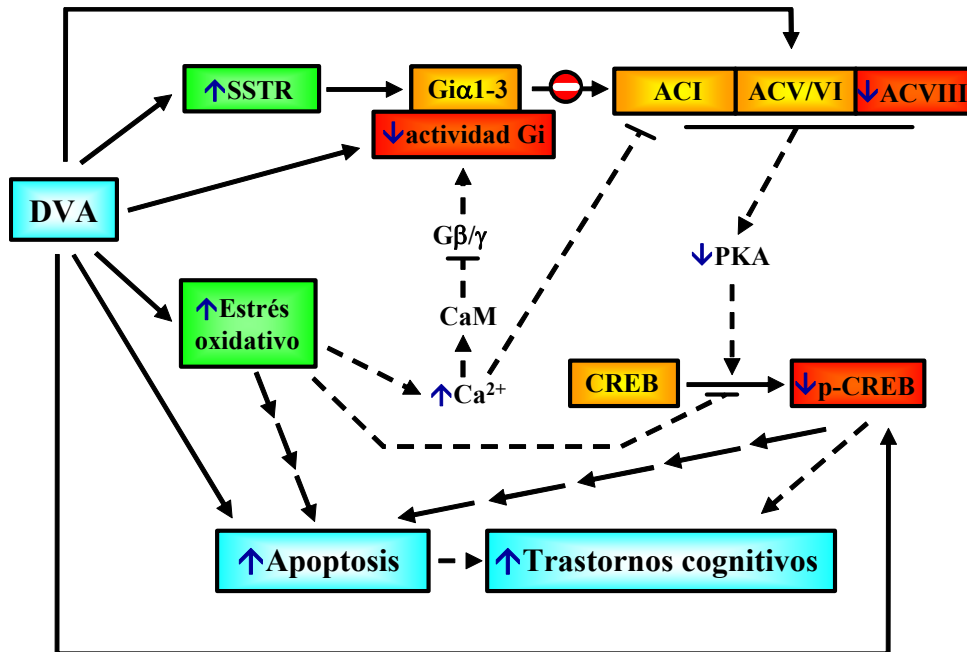
respuesta a la deficiencia vitamínica sino que aumentaran permite descartar la posibilidad de que el efecto del estrés oxidativo sea una degradación general de proteínas.

El último objetivo fue analizar si las alteraciones en las defensas antioxidantes y en el sistema receptor-efector de la SST inducidas por la deficiencia de VA en el hipocampo de la rata podrían conducir a un aumento en la muerte neuronal, ya que se ha demostrado que tanto la SST como la vitamina A están implicadas en la modulación de los procesos de supervivencia y muerte celular. La deficiencia de VA incrementó el número de células TUNEL(+) en el hipocampo de la rata, un hecho que refleja un incremento en la muerte celular programada en esta área cerebral. Dado que no se encontraron cambios en la actividad de ERK1/2 o JNK/SAPK, vías que se activan en respuesta al estrés oxidativo y que pueden aumentar la apoptosis (Tsuji y col., 2000; Blanc y col., 2003; Kubawara y col., 2008), sugerimos la implicación de la vía de CREB en dicho proceso, ya que se ha demostrado que la fosforilación de esta familia de proteínas puede regular la supervivencia neuronal (Putchá y col. 1999; Stumm y col., 2004). En apoyo de esta hipótesis, hemos demostrado que la deficiencia de VA induce una disminución en la actividad AC y en la expresión de ACVIII, que podría estar alterando la activación de CREB, como se ha descrito con anterioridad. Alternativamente, se ha descrito que el peróxido de hidrógeno, cuyos niveles aumentan en condiciones de estrés oxidativo, es capaz de inhibir la fosforilación de CREB sin alterar la fosforilación de ERK1/2 (Zhang y Jope, 1999), lo que también concuerda con los resultados de nuestro trabajo. Además, Dworet y Meinkoth (2006) observaron que una disminución en la fosforilación de CREB estimula la apoptosis mediante una alteración del ciclo celular, sin afectar a la expresión de otras proteínas proapoptóticas. Por consiguiente, la reducción de p-CREB podría explicar, al menos en parte, el incremento de la muerte neuronal detectado en el hipocampo de las ratas con deficiencia de VA (Figura 80).

Estos resultados demuestran que la VA es capaz de modular la vía de señalización de la SST y de ejercer efectos sobre los procesos de supervivencia y muerte celular en el hipocampo de la rata adulta. Además, dado el papel clave de la SST en los procesos cognitivos (Vecsei y col., 1984; Cacabelos y col., 1988; Matsuoka y col., 1995; Guillou y col., 1998), sugerimos que los trastornos en el aprendizaje y la memoria descritos previamente por varios autores en condiciones de deficiencia de VA (Misner y col., 2001;



Cocco y col., 2002; Stancampiano y col., 2007) podrían atribuirse, al menos en parte, a la alteración del sistema somatostatinérgico en esta área cerebral.



**Figura 80:** Resumen de los efectos de la deficiencia de vitamina A (DVA) sobre la vía del AMPc/PKA/CREB. Los recuadros indican los parámetros medidos en este trabajo. En rojo se destacan los valores que disminuyen respecto al control, en naranja los que no varían y en verde los que aumentan. Las flechas sólidas indican los efectos estudiados en este trabajo y las flechas discontinuas indican los efectos analizados por otros autores. El símbolo indica que esa vía no está implicada en el efecto. AC: adenilato ciclasa; CaM: calmodulina; CREB: proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc; Gβ/γ: Subunidad β/γ de las proteínas G heterotriméricas; p-CREB: CREB fosforilado; PKA: proteína quinasa A; SSTR: receptores de somatostatina



## 2. VITAMINA E

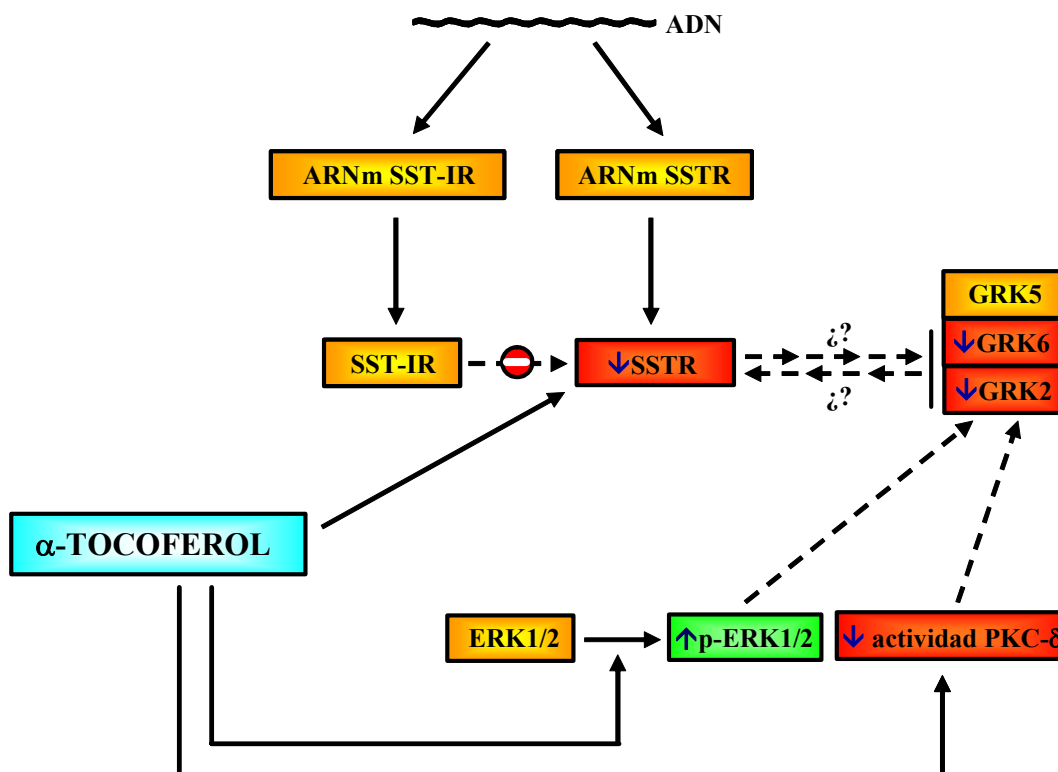
En este trabajo se demuestra que el  $\alpha$ -tocoferol, forma principal de la VE en el organismo, así como la deficiencia nutricional de dicha vitamina son capaces de modular el sistema receptor-efector de la SST en el hipocampo de la rata adulta.

El primer objetivo planteado en este estudio fue analizar la concentración de SST-IR en el hipocampo en condiciones de deficiencia de VE o tras su administración. En las ratas control, dicha concentración fue coherente con la descrita previamente por nuestro grupo (Puebla y Arilla-Ferreiro, 2003; Izquierdo-Claros y col., 2004) y por otros autores (Patel y Reichlin, 1978). Existen pruebas que indican que los tocoferoles y los tocotrienoles pueden modular la liberación de péptidos cuya ruta de síntesis es similar a la de la SST, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés) (Schindler y Mentlein, 2006). Sin embargo, la concentración de SST-IR en el hipocampo fue similar entre los distintos grupos experimentales estudiados y se correlacionó con los niveles de ARNm del péptido, lo que indica que ni la deficiencia de VE ni la administración del  $\alpha$ -tocoferol alteraron la expresión del gen de la SST.

Los parámetros de equilibrio de la unión de la SST a sus receptores en membranas de hipocampo derivadas de ratas control son similares a los descritos previamente por nuestro grupo y otros autores (Srikant y Patel, 1981; Epelbaum y col., 1982; Aguado-Llera y col., 2005; Hervás-Aguilar y col., 2005). El tratamiento de las ratas con  $\alpha$ -tocoferol, sin embargo, provocó una disminución significativa en el número de sitios de unión para la  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SST-14, que se correlacionó con una reducción en los niveles proteicos de SSTR1-SSTR4. Esta menor expresión proteica, sin embargo, no se acompañó de cambios paralelos en los niveles del ARNm correspondiente, lo que demuestran que los efectos del  $\alpha$ -tocoferol se ejercen a nivel post-transcripcional; podrían deberse a alteraciones en la eficiencia de la traducción del ARNm, en el procesamiento ulterior de la proteína, o en la maquinaria de internación o desensibilización del receptor (Niki, 1987; Ricciarelli y col., 2001; Azzi y col., 2002). Defectos en el transporte de la proteína recién sintetizada a la membrana plasmática o en la inserción del receptor en la membrana plasmática podrían también contribuir a estos cambios en el número de SSTR. Se ha comprobado recientemente que el  $\alpha$ -tocoferol ayuda a estabilizar la estructura de las membranas lipídicas (Wang y Quinn, 2000; Bradford y col.,

2003; Quinn, 2004). Por lo tanto, cambios en la estructura de la membrana podrían estar implicados en dicha reducción.

Un mecanismo relevante para la regulación de los receptores de neurotransmisores es aquel inducido por las GRK. En este estudio, el  $\alpha$ -tocoferol indujo una disminución en el contenido proteico de la GRK2 y la GRK6 en membranas de hipocampo, sin alterar el de la GRK5. No se analizaron ni la GRK3 ni la GRK4 debido a su limitada distribución en el cerebro. Los cambios observados en la expresión de las dos isoformas de GRK en cerebro resultaron bastante llamativos ( $\sim 40\%$  para GRK2 y  $\sim 71\%$  para GRK6) y se ha demostrado que incluso pequeños cambios en la disponibilidad de las GRK pueden ser funcionalmente importantes. Nuestros resultados sugieren que la reducción del número de SSTR en las membranas de hipocampo no es un reflejo de una mayor internación de los mismos mediada por las GRK (Figura 81).



**Figura 81:** Resumen de los efectos del  $\alpha$ -tocoferol sobre los receptores de somatostatina (SSTR). Los recuadros indican los parámetros medidos en este trabajo. En rojo se destacan los valores que disminuyen respecto al control, en naranja los que no varían y en verde los que aumentan. Las flechas sólidas indican los efectos estudiados en este trabajo y las flechas discontinuas indican los efectos analizados por otros autores. El símbolo  $\ominus$  indica que esa vía no está implicada en el efecto. ERK: quinasa dependiente de estímulos extracelulares; GRK: quinasa de los receptores acoplados a proteínas G; p-ERK: ERK fosforilado; PKC: proteína quinasa C; SST-IR: somatostatina inmunorreactiva; SSTR: receptores de somatostatina.



En el momento actual, se desconoce el mecanismo molecular responsable de la menor expresión de la GRK2 y GRK6 inducida por el  $\alpha$ -tocoferol. No obstante, se ha demostrado que la GRK2, en particular, es un sustrato de la PKC (Penn y col., 2000) y que la PKC activa la GRK2 potenciando así su traslado desde el citosol a la membrana plasmática (Winstel y col., 1996). El  $\alpha$ -tocoferol, por el contrario, inhibe la actividad PKC *in vivo*, como hemos observado en el hipocampo de las ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol y como corroboran los estudios de otros autores (Ferri y col., 2006). Por consiguiente, es posible que la inhibición de la PKC contribuya, al menos en parte, a la reducción de la GRK2. Por otra parte, se ha demostrado que la concentración de GRK2 en las células está bajo el control de múltiples factores, tanto a nivel transcripcional como a nivel de la degradación proteica. Así, se ha visto que la fosforilación de esta proteína por quinasas como s-Src (Penela y col., 2001) y ERK (Elorza y col., 2003), o su ubiquitinación por la E3-ubiquitina ligasa Mdm2 (Salcedo y col., 2006), potencian la tasa de degradación de GRK2. Como muestran nuestros resultados, el tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol aumentó significativamente los niveles de p-ERK1/2 en el hipocampo. Por lo tanto, la mayor activación de ERK1/2 inducida por esta vitamina podría traducirse en un incremento en la tasa de degradación de la GRK2, lo que conduciría a cambios en su disponibilidad. La GRK6, por otra parte, es una proteína palmitoilada que se encuentra casi exclusivamente en la membrana plasmática y es insensible a la regulación por G $\beta$ / $\gamma$ , por lo que es altamente probable que esté sujeta a mecanismos reguladores distintos a los de la GRK2.

Diversos autores también han observado un paralelismo entre la densidad de receptores de membrana y la expresión de GRK2. Un estudio reciente *in vivo*, por ejemplo, ha demostrado que el tratamiento de ratas hembra con estradiol induce una regulación a la baja de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos que se asocia con reducciones concomitantes en la inmunodensidad, la actividad enzimática y los niveles del ARNm de GRK2 en cerebro (Ansonoff y col., 2001). De modo similar, la adicción a opiáceos en humanos se asocia con una regulación a la baja de los receptores  $\mu$ OP, de las GRK2/6 y de la  $\beta$ -arrestina-2, lo que sugiere que la expresión de estas proteínas se regula en paralelo (Ferrer-Alcón y col., 2004). Por consiguiente, la reducción en el contenido proteico de GRK2 y GRK6 inducida por el  $\alpha$ -tocoferol en el hipocampo de la rata podría interpretarse como una forma de compensar la menor densidad y el funcionamiento anormalmente bajo del complejo SSTR/proteína Gi. No



obstante, dado que estas quinasas fosforilan una variedad de GPCR en el cerebro, no se puede descartar la posibilidad de que la reducción de GRK2 y GRK6 refleje anomalías en otros sistemas de neurotransmisión. Alternativamente, la deficiencia de GRK2 y GRK6 podría conducir a la hipofunción de la neurotransmisión somatostatinérgica.

Se sabe que existen otras quinasas que median la fosforilación e internación de los GPCR, entre las que destacan la PKA y la PKC (Oomen y col., 2001; Gainetdinov y col., 2004; Kelly y col., 2008). En este trabajo hemos observado, como se discute más adelante, una mayor actividad basal y estimulada de la enzima AC en el grupo de ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol. Este resultado concuerda con un estudio *in vitro* de Ottino y Duncan (1996) en el que se encontró que el tratamiento de células BL6 con succinatos de VE induce un aumento significativo en la actividad de dicha enzima. Estos datos llevan a pensar que el incremento en la actividad AC incrementaría la actividad de la PKA, lo que podría conducir a una mayor fosforilación y, por tanto, internación de los SSTR, contribuyendo así a la menor densidad de estos receptores detectada en las membranas del hipocampo de estas ratas.

Alternativamente, podría existir un trastorno en la maquinaria molecular encargada de reciclar los receptores internados y devolverlos a la superficie celular, lo que se reflejaría en un menor número de SSTR en la membrana. En este sentido, juegan un papel importante determinadas proteína fosfatasas, como la PP2A, que defosforila los GPCR permitiendo su reciclaje y su reacomplamiento con las proteínas G. Sin embargo, algunos autores han demostrado que el  $\alpha$ -tocoferol incrementa la actividad de la calcineurina (Azzi y Stocker, 2000), por lo que parece poco probable que este mecanismo esté implicado. No obstante, serán necesarios estudios posteriores que permitan profundizar en este aspecto.

Está ampliamente demostrado que los cinco subtipos de SSTR inhiben la AC y, de este modo, reducen los niveles intracelulares de AMPc (Hannon y col., 2002), una molécula determinante para la supervivencia celular (Putcha y col. 1999; Stumm y col., 2004). Como se ha comentado anteriormente, en este trabajo hemos demostrado que el  $\alpha$ -tocoferol aumenta la actividad de la AC (Clark y col., 1988; Kelly, 2008). En el momento actual, se desconoce el mecanismo molecular implicado en dicho aumento. Hemos encontrado que los niveles proteicos de ACV/VI no se alteran en respuesta a la administración de  $\alpha$ -tocoferol mientras que se produce un aumento en los de la ACVIII. Además, se ha descrito que la ACVIII es activada por  $\text{Ca}^{2+}$  de un modo dependiente de la CaM mientras que la ACV y la



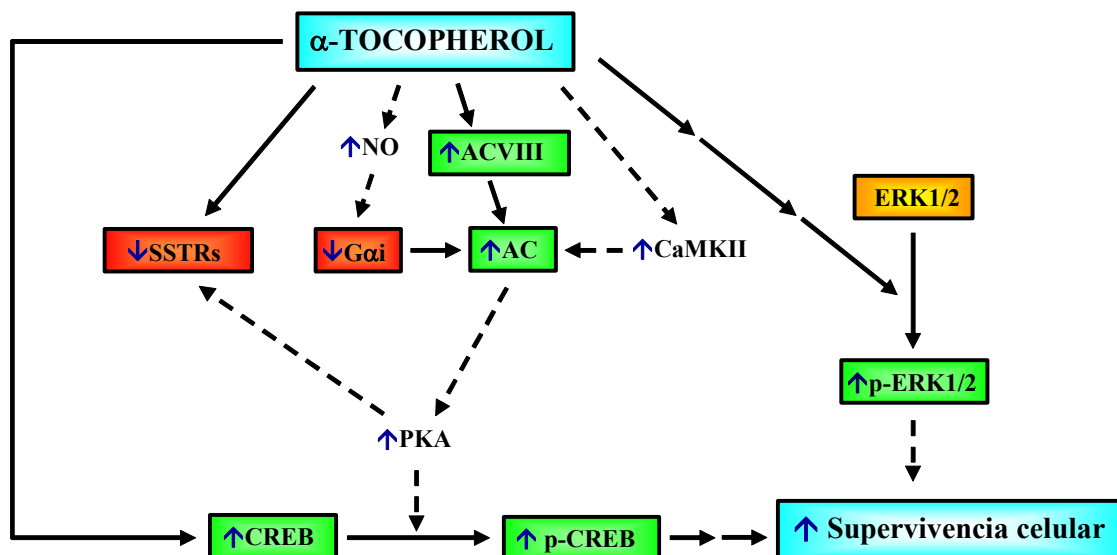
ACVI se inhiben en presencia de este catión, independientemente de la CaM (Cooper y col., 1998; Sunahara y Taussig, 2002). Recientemente, Heller y col. (2004) propusieron que el  $\alpha$ -tocoferol podría activar la CaMKII. Estos resultados parecen indicar que el aumento de la actividad AC, tanto en condiciones basales como estimuladas por FK, detectado en las ratas tratadas con esta vitamina, es consecuencia del aumento en la expresión o actividad de la ACVIII. Por otro lado, existe la posibilidad de que el efecto del  $\alpha$ -tocoferol sobre la actividad AC sea una consecuencia directa de una alteración en la funcionalidad o expresión de las proteínas  $G_{i\alpha}$ . En apoyo a esta hipótesis, detectamos una reducción en la inhibición mediada por Gpp(NH)p de la actividad AC estimulada por FK en las membranas procedentes de las ratas tratadas con el  $\alpha$ -tocoferol, lo que indica una pérdida de proteínas Gi funcionales. Proponemos, por lo tanto, que el efecto del  $\alpha$ -tocoferol sobre la actividad AC podría ser un efecto en cascada, iniciada por la disminución de  $G_{i\alpha 1,2}$  o 3.

La alterada funcionalidad de las proteínas Gi se correlacionó con una disminución en los niveles proteicos de las tres subunidades  $\alpha_i$  estudiadas. Así, la concentración proteica de  $G_{i\alpha 2}$  en el hipocampo de las ratas tratadas con  $\alpha$ -tocoferol representó un 60% del valor control, mientras que los niveles de  $G_{i\alpha 1}$  y  $G_{i\alpha 3}$  representaron el 70% y el 75%, respectivamente, del valor control. Otros autores también han descrito una correlación entre una reducida expresión de proteínas Gi y una reducción o atenuación de la funcionalidad de Gi (Anand-Srivastava, 1993; Marcil y col., 1996). Hay que destacar que el  $\alpha$ -tocoferol es capaz de incrementar la actividad de la óxido nítrico (NO) sintasa (NOS) (Newaz et al., 1999; Heller y col., 2004) y el NO, a su vez, ha demostrado ser capaz de inhibir la expresión de las proteínas  $G_{\alpha i}$  (Bassil y Anand-Srivastava, 2006). Por consiguiente, proponemos que, en nuestro estudio, el  $\alpha$ -tocoferol puede haber ejercido sus efectos sobre los niveles de  $G_{\alpha i}$  a través de un incremento de NO en el hipocampo. El conjunto de estos resultados sugiere, además, que la menor cantidad o funcionalidad de las proteínas Gi junto con la disminución del número de SSTR podrían ser los responsables de la atenuada inhibición de la AC por la SST inducida por el  $\alpha$ -tocoferol.

Una vez caracterizados los efectos del  $\alpha$ -tocoferol sobre las proteínas Gi y la AC, se analizó la fosforilación de CREB. Diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia que desempeña la vía de la AC/PKA/AMPC en la supervivencia neuronal y plasticidad sináptica (Finkbeiner, 2000; Nakagawa et al., 2002). Como se ha descrito previamente,

CREB es una familia constituida por dos factores de transcripción que son fosforilados por la PKA en residuos de serina, lo que induce su capacidad de estimular la transcripción de genes que contienen un CRE en su región promotora (Yamamoto et al., 1988; González y Montminy, 1989). CREB, además de regular la diferenciación y supervivencia neuronal, contribuye también a la proliferación de las células precursoras de neuronas (Finkbeiner, 2000; Nakagawa y col. 2002). Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que el  $\alpha$ -tocoferol incrementa la fosforilación de CREB, posiblemente a través del aumento en la actividad de la AC. Dado que el  $\alpha$ -tocoferol estimula la vía AC/PKA/CREB, esta vitamina podría conducir a un incremento en la supervivencia celular a través del aumento en los niveles intracelulares de AMPc (Figura 82).

Con el fin de comprender mejor el papel de la VE en el hipocampo de la rata, se caracterizaron también los efectos de una deficiencia de VE sobre la transmisión somatostatinérgica en dicha área cerebral. Como muestran los ensayos de unión, la alimentación de las ratas, durante 9 semanas, con un pienso sin VE indujo un incremento significativo del número de sitios de unión para la  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST-14}$ , concomitante con un incremento en la expresión proteica de todos los subtipos de SSTR analizados (SSTR1-



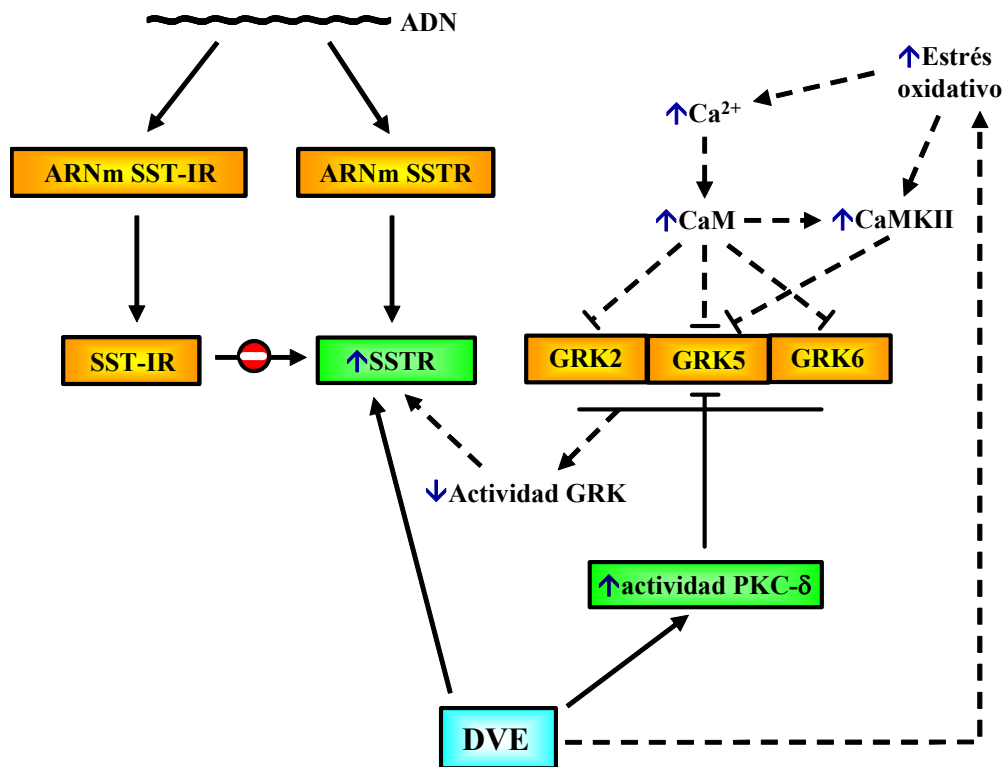
**Figura 82: Resumen de los efectos del  $\alpha$ -tocoferol sobre la supervivencia celular.** Los recuadros indican los parámetros medidos en este trabajo. En rojo se destacan los valores que disminuyen respecto al control, en naranja los que no varían y en verde los que aumentan. Las flechas sólidas indican los efectos estudiados en este trabajo y las flechas discontinuas indican los efectos analizados por otros autores. AC: Adenilato ciclasa; CREB: proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc; ERK: quinasa dependiente de estímulos extracelulares; p-CREB: CREB fosforilado; p-ERK: ERK fosforilado; SSTR: receptores de somatostatina.



SSTR4). La deficiencia de la VE, sin embargo, no alteró los niveles de ARNm de estos receptores, indicando, de nuevo, que estos efectos se producen a nivel post-transcripcional. Postulamos que, en este grupo de ratas, el mecanismo de internación de los SSTR podría estar alterado. Como se ha descrito anteriormente, la fosforilación de los GPCR mediada por las GRK es una de las señales necesarias para la internación de los mismos. En el grupo de ratas con deficiencia de VE, no se hallaron cambios en el contenido proteico de ninguna de las GRK analizadas. No obstante, la deficiencia vitamínica podría haber alterado la actividad de dichas quinasas. En este sentido, se sabe que la PKC no solo activa a la GRK2, como se ha descrito previamente, sino que también es un potente inhibidor de la GRK5 (Pronin y Benovic, 1997). En el hipocampo de las ratas con deficiencia de VE, se observó un aumento significativo de la densidad de PKC- $\delta$  en la membrana plasmática, lo que sugiere una mayor activación de esta enzima. Esta mayor presencia de la PKC en la membrana podría conducir a una inhibición de la actividad de la GRK5 que, a su vez, podría explicar el incremento en la densidad de los SSTR detectado en las membranas de hipocampo procedentes de este grupo de ratas (Figura 83).

Por otro lado, numerosos autores han demostrado que la VE es un potente antioxidante y que su ausencia provoca trastornos en la membrana mitocondrial que conducen a un incremento en los niveles celulares de ERO, principalmente del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno (Chow y col., 1999; Armeni y col., 2003; Sabat y col., 2008). Además, se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno es capaz de activar la CaMKII, que es otro inhibidor de la actividad de las GRK (Lao y col., 2002). Por lo tanto, el estrés oxidativo al que están sometidas las ratas con deficiencia de VE podría disparar los niveles de peróxido de hidrogeno y éste, al activar la CaMKII, conduciría a la inhibición de la actividad de las GRK, contribuyendo así a una menor internación de los SSTR. Alternativamente, se ha demostrado que las ERO pueden incrementar los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  al activar los canales de  $Ca^{2+}$  y modificar la actividades de la bomba de  $Na^+/Ca^{2+}$  y de la bomba  $Ca^{2+}$ -ATPasa (Feissner y col., 2009). El incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular puede activar la CaM y se ha demostrado que esta enzima inhibe fuertemente la GRK5 y GRK6 y moderadamente la GRK2 (Sallese y col., 2000). Además, este incremento en la CaM activada podría también incrementar la actividad de la CaMKII y, por tanto, la inhibición de la GRK5. En apoyo a esta teoría, se ha descrito, en otros tejidos, que la





**Figura 83: Resumen de los efectos de una deficiencia de vitamina E (DVE) sobre los receptores de somatostatina (SSTR).** Los recuadros indican los parámetros medidos en este trabajo. En naranja se destacan los valores que no varían respecto al control y en verde los que aumentan. Las flechas sólidas indican los efectos estudiados en este trabajo y las flechas discontinuas indican los efectos analizados por otros autores. El símbolo indica que esa vía no está implicada en el efecto. CaM: Calmodulina; CaMKII: quinasa dependiente de CaM tipo II; GRK: quinasa de los receptores acoplados a proteínas G; PKC: proteína quinasa C; SST-IR: somatostatina inmunorreactiva.

deficiencia de VE, a través de un incremento del estrés oxidativo, puede generar trastornos en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  (Huang y col., 2009) (Figura 83).

Como se ha descrito anteriormente, uno de los efectores que median las acciones proapoptóticas de la SST es la superfamilia de las PTP (Florio, 2008b). En nuestro trabajo se demuestra, por primera vez, que la deficiencia de VE induce un aumento en la actividad de estas enzimas en membranas de hipocampo de rata adulta. Se ha demostrado que muchos miembros de esta superfamilia están sometidos a una regulación de tipo redox que los hace sensibles a los niveles de ERO en la célula (Tonks, 2005); así, algunas PTP, como la PTP-1B, se desactivan en presencia de peróxido de hidrógeno (Haase y Maret, 2005; Gracanin y Davies, 2007). Dado que está ampliamente descrito que la deficiencia de VE genera estrés oxidativo, podría pensarse que la actividad PTP estaría disminuida en el



hipocampo de este grupo de ratas. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que otras isoformas, como la SHP-2, se activan en condiciones de estrés oxidativo por una activación de los “complejos multiefectores” que estas enzimas forman en la membrana plasmática (Park y col., 2009). Es importante tener en cuenta que en nuestro estudio, se utilizaron membranas para medir la actividad PTP, por lo que es posible que el incremento de dicha actividad detectado en las ratas deficitarias en VE sea debido, en parte, a una activación de los “complejos multiefectores” por el estrés oxidativo. Por otro lado, se ha demostrado que la PKC- $\delta$  puede fosforilar y activar determinadas RPTP, como la PTP $\alpha$  (Brandt y col., 2003) o la PTP $\mu$  (Rosdahl y col., 2002). Por consiguiente, el incremento de la PKC- $\delta$  detectado en las membranas de hipocampo de las ratas alimentadas sin VE podría contribuir también a la mayor actividad PTP.

Los análisis mediante inmunoblot muestran también una sobreexpresión de la PTP $\eta$  en el hipocampo de las ratas con deficiencia de VE en comparación con las ratas control. Esta enzima es una RPTP que está ampliamente distribuida en el cerebro y que ejerce efectos antiproliferativos, ya que tiene la capacidad de defosforilar y desactivar a ERK (Massa y col., 2004; Arena y col., 2007; Florio, 2008b). Dado que la actividad de la PTP $\eta$  se encuentra regulada, en parte, por la SHP-2 en los “complejos multiefectores” (Florio, 2008b), la deficiencia de VE, al incrementar las ERO, podría estar activando la PTP $\eta$  de un modo dependiente de SHP-2. A su vez, esta mayor activación podría explicar también el incremento en la actividad PTP detectado en esta área cerebral. El descenso en la fosforilación de ERK1/2 observado en este grupo de ratas apoya esta hipótesis (Figura 84).

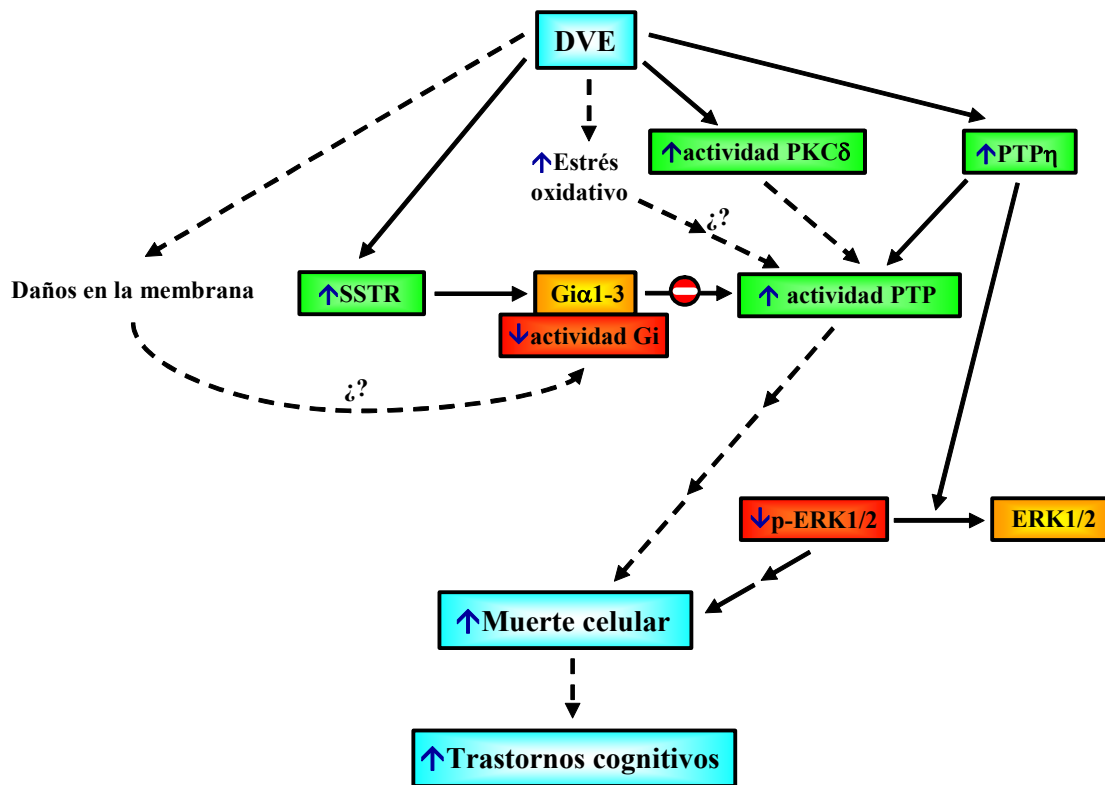
Aunque no se encontraron cambios en la actividad AC en el grupo de ratas con deficiencia de VE, los resultados muestran una pérdida de respuesta de la AC y de las PTP al efecto inhibitor o estimulador, respectivamente, de la SST, que se restableció tras la administración de  $\alpha$ -tocoferol, lo que sugiere una alteración en la eficiencia del acoplamiento de los SSTR a los efectores. Aunque la expresión proteica de Gi $\alpha$ 1, Gi $\alpha$ 2 y Gi $\alpha$ 3 no se vio alterada en estas ratas, los ensayos de dosis-respuesta con el análogo de GTP Gpp(NH)p mostraron una disminución en la actividad de dichas proteínas. Se ha demostrado que la subunidad  $\alpha$  de las proteínas Gi tiende a asociarse a zonas de la membrana con estructura de líquido ordenado ( $l_o$ ), distintas a las zonas donde se une la subunidad  $\beta/\gamma$  (Abankwa y Vogel, 2007; Yuyama y col., 2007). Esto favorece que, tras la activación del GPCR y la disociación




de la proteína G heterotrimérica, la subunidad  $\alpha$  se traslade a dominios de la membrana plasmática en donde se encuentran los efectores. En este sentido, se ha demostrado que la mayor parte de los efectores, como la AC o algunas PTP, se encuentran formando complejos en zonas de la membrana con configuración  $l_o$ , también denominadas “balsas lipídicas” o *lipid-rafts* (Chini y Parenti, 2004; Maksumova y col., 2005; Pagano y col., 2009), que son ricas en esfingolípidos y colesterol. Numerosos experimentos han permitido comprobar que el tocoferol juega un papel muy importante en la estabilización de estas estructuras y, por tanto, que su ausencia podría tener consecuencias sobre las cascadas de transducción de señales (Wang y Quinn, 2000; Bradford y col., 2003; Quinn, 2004). Se sabe, por ejemplo, que la oxidación del colesterol a 7-cetocolesterol, en condiciones de estrés oxidativo, daña la estructura las balsas lipídicas y que el tocoferol ayuda a restablecer la formación lipídica impidiendo la oxidación del colesterol (Royer y col., 2009). Por consiguiente, la ausencia de VE en el hipocampo de la rata podría generar trastornos en las balsas lipídicas y, de este modo, alterar el acoplamiento de las proteínas G a los efectores, lo que quedaría reflejado en una menor capacidad de la SST para inhibir la AC o estimular las PTP (Figura 84).

Finalmente, analizamos si las alteraciones detectadas en la vía de transducción de señales de la SST en condiciones de deficiencia de VE podrían incrementar la muerte celular en el hipocampo de la rata adulta. Los resultados demuestran una mayor presencia de células TUNEL(+) en este grupo experimental que disminuye tras la administración de  $\alpha$ -tocoferol durante una semana, unos resultados coherentes con los de Ferri y col. (2003). Puesto que las ratas alimentadas sin VE presentaron un incremento en la actividad PTP y en la expresión de la PTP $\eta$ , así como una disminución en la fosforilación de ERK1/2, es posible que estas alteraciones sean responsables, al menos en parte, del incremento observado en la muerte celular en el hipocampo (Figura 84).

El conjunto de los resultados presentados demuestra que la VE juega un papel importante en la regulación del sistema somatostatinérgico en el hipocampo maduro y sugiere que este sistema puede ser uno de los mecanismos por el cual esta vitamina modula los procesos cognitivos y/o la supervivencia neuronal.



**Figura 84:** Resumen de los efectos de una deficiencia de vitamina E (DVE) sobre la vía de las fosfotirosina fosfatasas (PTP). Los recuadros indican los parámetros medidos en este trabajo. En rojo se destacan los valores que disminuyen respecto al control, en naranja los que no varían y en verde los que aumentan. Las flechas sólidas indican los efectos estudiados en este trabajo y las flechas discontinuas indican los efectos analizados por otros autores. El símbolo  indica que esa vía no está implicada en el efecto. CaM: Calmodulina; CaMKII: quinasa dependiente de CaM tipo II; PKC: proteína quinasa C; SSTR: receptor de somatostatina; somatostatina inmunorreactiva;

## *Conclusiones*

“La ciencia se compone de errores que, a su vez, son los pasos hacia la verdad”.  
[Julio Verne]





## CONCLUSIONES

1- La deficiencia de vitamina A reduce los niveles de somatostatina inmunorreactiva en el hipocampo de la rata adulta, sin modificar los niveles del ARN mensajero correspondiente. Dicha reducción se correlaciona con una menor expresión de la prohormona convertasa 2, lo que sugiere que es consecuencia de una alteración en el procesamiento del precursor pro-somatostatina.

2- La deficiencia de vitamina A aumenta la unión del trazador  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -somatostatina-14 a sus receptores en el hipocampo de la rata adulta. Este efecto se debe a un aumento en los niveles proteicos de los subtipos de receptores de somatostatina SSTR1-SSTR4 que no es consecuencia de alteraciones en la tasa de transcripción génica, como evidencia la ausencia de cambios en el ARN mensajero correspondiente. La menor expresión de GRK5 en esta área cerebral en condiciones de deficiencia de vitamina A orienta a una reducción en la internación de los receptores de somatostatina como mecanismo implicado en la regulación al alza de los mismos.

3- En el hipocampo de la rata adulta, se produce una disminución en la actividad adenilato ciclasa basal y estimulada por forskolina en condiciones de deficiencia de vitamina A, que puede atribuirse, al menos en parte, a una menor expresión proteica de la isoforma ACVIII. Además, dicha deficiencia vitamínica reduce la capacidad de la somatostatina para inhibir la adenilato ciclasa, probablemente como resultado de la pérdida de funcionalidad de las proteínas Gi.

4- La deficiencia de vitamina A disminuye la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB), una molécula implicada en procesos cognitivos y en la supervivencia neuronal. Tanto la reducción en la actividad adenilato ciclasa como en la expresión de la ACVIII explicarían esta menor fosforilación de CREB, que, a su vez, podría explicar el incremento de la muerte celular programada observado en el hipocampo de estas ratas.



5- La deficiencia de VA aumenta el estrés oxidativo en el hipocampo de la rata adulta, como pone de manifiesto el aumento de la peroxidación de lípidos, la reducción de la ratio glutation reducido/glutacion oxidado y la reducción en la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa. Estas condiciones prooxidantes podrían ser también parcialmente responsables de los cambios detectados en los niveles de GRK5, de la adenilato ciclasa, de CREB fosforilado o de los receptores de somatostatina, ya que dichas alteraciones revierten tras el tratamiento con todo-*trans*-retinol, que reduce el estrés oxidativo en esta área cerebral.

6- El  $\alpha$ -tocoferol, forma principal de la vitamina E en los tejidos, no altera la expresión de la somatostatina pero disminuye la unión del trazador  $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -somatostatina-14 a sus receptores en el hipocampo de la rata adulta, mientras que la deficiencia de VE ejerce el efecto contrario. Estas alteraciones se correlacionan con cambios paralelos en la expresión proteica de los receptores SSTR1 a SSTR4, que es consecuencia de modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales, como muestra la ausencia de cambios en el ARN mensajero correspondiente. El menor contenido proteico de GRK2 y GRK6 en las membranas de hipocampo en respuesta al  $\alpha$ -tocoferol sugiere que puede existir, entre otros, un mecanismo compensatorio que regula la expresión de estas quinasas en respuesta a la densidad de receptores presentes en la membrana o viceversa.

7- La inhibición de la actividad PKC inducida por el  $\alpha$ -tocoferol en el hipocampo de la rata podría contribuir al descenso en los niveles de GRK2 en la membrana, ya que se sabe que la PKC es capaz de activar GRK2. Por otro lado, el aumento de ERK1/2 fosforilado, inducido por este tratamiento, puede conducir a una mayor degradación de la GRK2, provocando así cambios en su disponibilidad. Por otro lado, dado que la PKC es un potente inhibidor de la GRK5, el aumento de la densidad de la isoforma PKC- $\delta$  en la membrana plasmática del hipocampo de ratas con deficiencia de VE podría explicar el incremento en la densidad de los receptores de somatostatina detectado en este grupo de ratas.





8- La expresión y la funcionalidad de las proteínas  $G_i$  disminuyen en respuesta al  $\alpha$ -tocoferol. Esta alteración, junto con la regulación a la baja de los receptores de somatostatina, puede explicar la atenuada respuesta de la adenilato ciclasa y de las fosfotirosina fosfatasas al efecto inhibitor o estimulador, respectivamente, de la somatostatina.

9- La administración de  $\alpha$ -tocoferol induce un incremento en la actividad de la adenilato ciclasa en el hipocampo de la rata adulta, que se acompaña de una sobreexpresión de la isoforma ACVIII. Este incremento en la actividad de la vía adenilato ciclasa/PKA explicaría la mayor fosforilación de CREB.

10- La deficiencia de vitamina E incrementa la actividad fosfotirosina fosfatasa en el hipocampo de la rata adulta. Este aumento se debe, en parte, a una sobreexpresión de la PTP $\eta$  y a un incremento en la actividad de la PKC- $\delta$ . La mayor expresión de la PTP $\eta$  conduce a una disminución en la fosforilación de ERK1/2, quinasas implicadas en la regulación de la supervivencia celular y, así, podría conducir a un incremento en los procesos de muerte celular programada en el hipocampo, como muestra el aumento en el número de células TUNEL-positivas detectado en esta área cerebral.

**En su conjunto**, los presentes resultados indican que los niveles plasmáticos y tisulares de las vitaminas liposolubles A y E pueden alterar la expresión y funcionalidad de diferentes proteínas implicadas en la vía de transducción de señales de la somatostatina, en el hipocampo de la rata adulta, y sugieren que la modulación del sistema somatostatinérgico puede estar implicada en el mecanismo mediante el cual, ambas vitaminas, regulan los procesos de aprendizaje y memoria así como la supervivencia celular.

## *Bibliografía*

“La sabiduría de los sabios y la experiencia de los siglos pueden ser conservadas con las citas”.  
[Benjamin Disraeli]

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abankwa, D. y Vogel, H. (2007).** "A FRET map of membrane anchors suggests distinct microdomains of heterotrimeric G proteins". *J Cell Sci* 120 (Pt 16): 2953-2962.
- Abate, A.; Yang, G.; Dennery, P.A.; Oberle, S. y Schroder, H. (2000).** "Synergistic inhibition of cyclooxygenase-2 expression by vitamin E and aspirin". *Free Radic Biol Med* 29 (11): 1135-1142.
- Aboitiz, F.; Morales, D. y Montiel, J. (2003).** "The evolutionary origin of the mammalian isocortex: towards an integrated developmental and functional approach". *Behav Brain Sci* 26 (5): 535-552; discussion 552-585.
- Aebi, H. (1984).** "Catalase in vitro". *Methods Enzymol* 105: 121-126.
- Agarwal, A.; Prabakaran, S.A. y Said, T.M. (2005).** "Prevention of oxidative stress injury to sperm". *J Androl* 26 (6): 654-660.
- Aguado-Llera, D.; Arilla-Ferreiro, E.; Campos-Barros, A.; Puebla-Jiménez, L. y Barrios, V. (2005).** "Protective effects of insulin-like growth factor-I on the somatostatinergic system in the temporal cortex of beta-amyloid-treated rats". *J Neurochem* 92 (3): 607-615.
- Aguado-Llera, D.; Puebla-Jiménez, L.; Yébenes-Gregorio, L. y Arilla-Ferreiro, E. (2007).** "Alteration of the somatostatinergic system in the striatum of rats with acute experimental autoimmune encephalomyelitis". *Neuroscience* 148 (1): 238-249.
- Akmal, K.M.; Dufour, J.M. y Kim, K.H. (1997).** "Retinoic acid receptor alpha gene expression in the rat testis: potential role during the prophase of meiosis and in the transition from round to elongating spermatids". *Biol Reprod* 56 (2): 549-556.
- Alderton, F.; Fan, T.P. y Humphrey, P.P. (2001).** "Somatostatin receptor-mediated arachidonic acid mobilization: evidence for partial agonism of synthetic peptides". *Br J Pharmacol* 132 (3): 760-766.
- Alfos, S.; Boucheron, C.; Pallet, V.; Higuieret, D.; Enderlin, V.; Beracochea, D.; Jaffard, R. y Higuieret, P. (2001).** "A retinoic acid receptor antagonist suppresses brain retinoic acid receptor overexpression and reverses a working memory deficit induced by chronic ethanol consumption in mice". *Alcohol Clin Exp Res* 25 (10): 1506-1514.
- Alonso, A.; Sasin, J.; Bottini, N.; Friedberg, I.; Friedberg, I.; Osterman, A.; Godzik, A.; Hunter, T.; Dixon, J. y Mustelin, T. (2004).** "Protein tyrosine phosphatases in the human genome". *Cell* 117 (6): 699-711.
- Álvarez, B. y Radi, R. (2003).** "Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins". *Amino Acids* 25 (3-4): 295-311.
- Álvaro, I. y Arilla, E. (1992).** "Somatostatin receptor elevation in rat striatum after diisopropylfluorophosphate administration". *Brain Res Bull* 28 (4): 513-518.
- Amaral, D.G. y Witter, M.P. (1989).** "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data". *Neuroscience* 31 (3): 571-591.
- Amaral, D.G.; Scharfman, H.E. y Lavenex, P. (2007).** "The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies)". *Prog Brain Res* 163: 3-22.
- Anand-Srivastava, M.B. (1993).** "Platelets from spontaneously hypertensive rats exhibit decreased expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. Relation with adenylyl cyclase activity". *Circ Res* 73 (6): 1032-1039.
- Andersen, P.; Bliss, T.V. y Skrede, K.K. (1971).** "Unit analysis of hippocampal population spikes". *Exp Brain Res* 13 (2): 208-221.



- Andrisani, O.M. y Dixon, J.E. (1990).** "Somatostatin gene regulation". *Annu Rev Physiol* 52: 793-806.
- Andrisani, O.M. (1999).** "CREB-mediated transcriptional control". *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 9 (1): 19-32.
- Ansonoff, M.A. y Etgen, A.M. (2001).** "Receptor phosphorylation mediates estradiol reduction of alpha2-adrenoceptor coupling to G protein in the hypothalamus of female rats". *Endocrine* 14 (2): 165-174.
- Aoki, H.; Kang, P.M.; Hampe, J.; Yoshimura, K.; Noma, T.; Matsuzaki, M. y Izumo, S. (2002).** "Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes". *J Biol Chem* 277 (12): 10244-10250.
- Araújo, D.M.; Lapchak, P.A.; Collier, B. y Quirion, R. (1990).** "Evidence that somatostatin enhances endogenous acetylcholine release in the rat hippocampus". *J Neurochem* 55 (5): 1546-1555.
- Arena, S.; Pattarozzi, A.; Massa, A.; Esteve, J.P.; Iuliano, R.; Fusco, A.; Susini, C. y Florio, T. (2007).** "An intracellular multi-effector complex mediates somatostatin receptor 1 activation of phospho-tyrosine phosphatase eta". *Mol Endocrinol* 21 (1): 229-246.
- Armeni, T.; Principato, G.; Quiles, J.L.; Pieri, C.; Bompadre, S. y Battino, M. (2003).** "Mitochondrial dysfunctions during aging: vitamin E deficiency or caloric restriction—two different ways of modulating stress". *J Bioenerg Biomembr* 35 (2): 181-191.
- Arshavsky, V.Y. y Pugh, E.N., Jr. (1998).** "Lifetime regulation of G protein-effector complex: emerging importance of RGS proteins". *Neuron* 20 (1): 11-14.
- Arushanyan, E.B. y Beier, E.V. (2008).** "The hippocampus and cognitive impairments". *Neurosci Behav Physiol* 38 (8): 751-758.
- Augood, S.J.; Kiyama, H.; Faull, R.L. y Emson, P.C. (1991).** "Dopaminergic D1 and D2 receptor antagonists decrease prosomatostatin mRNA expression in rat striatum". *Neuroscience* 44 (1): 35-44.
- Azzi, A. y Stocker, A. (2000).** "Vitamin E: non-antioxidant roles". *Prog Lipid Res* 39 (3): 231-255.
- Azzi, A.; Ricciarelli, R. y Zingg, J.M. (2002).** "Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E)". *FEBS Lett* 519 (1-3): 8-10.
- Babior, B.M. (1997).** "Superoxide: a two-edged sword". *Braz J Med Biol Res* 30 (2): 141-155.
- Baetens, D.; Malaisse-Lagae, F.; Perrelet, A. y Orci, L. (1979).** "Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction shows two types of islets of langerhans". *Science* 206 (4424): 1323-1325.
- Baghdoyan, H.A.; Lydic, R. y Fleegal, M.A. (1998).** "M2 muscarinic autoreceptors modulate acetylcholine release in the medial pontine reticular formation". *J Pharmacol Exp Ther* 286 (3): 1446-1452.
- Bain, G.; Ray, W.J.; Yao, M. y Gottlieb, D.I. (1996).** "Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture". *Biochem Biophys Res Commun* 223 (3): 691-694.
- Banday, A.A.; Marwaha, A.; Tallam, L.S. y Lokhandwala, M.F. (2005).** "Tempol reduces oxidative stress, improves insulin sensitivity, decreases renal dopamine D1 receptor hyperphosphorylation, and restores D1 receptor-G-protein coupling and function in obese Zucker rats". *Diabetes* 54 (7): 2219-2226.



- Baratta, M.V.; Lamp, T. y Tallent, M.K. (2002).** "Somatostatin depresses long-term potentiation and Ca<sup>2+</sup> signaling in mouse dentate gyrus". *J Neurophysiol* 88 (6): 3078-3086.
- Barber, D.L.; McGuire, M.E. y Ganz, M.B. (1989).** "Beta-adrenergic and somatostatin receptors regulate Na-H exchange independent of cAMP". *J Biol Chem* 264 (35): 21038-21042.
- Barco, A.; Bailey, C.H. y Kandel, E.R. (2006).** "Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory". *J Neurochem* 97 (6): 1520-1533.
- Barnett-Norris, J.; Lynch, D. y Reggio, P.H. (2005).** "Lipids, lipid rafts and caveolae: their importance for GPCR signaling and their centrality to the endocannabinoid system". *Life Sci* 77 (14): 1625-1639.
- Barrett, W.C.; DeGnore, J.P.; Keng, Y.F.; Zhang, Z.Y.; Yim, M.B. y Chock, P.B. (1999).** "Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B". *J Biol Chem* 274 (49): 34543-34546.
- Barrios, V.; Rodriguez-Sanchez, M.N. y Arilla, E. (1990).** "The effect of chronic administration of nicotine and withdrawal on somatostatin concentration and binding in brain of rat". *Neuropharmacology* 29 (11): 1025-1030.
- Bassil, M. y Anand-Srivastava, M.B. (2006).** "Nitric oxide modulates Gi-protein expression and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells". *Free Radic Biol Med* 41 (7): 1162-1173.
- Bastien, J. y Rochette-Egly, C. (2004).** "Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes". *Gene* 328: 1-16.
- Basu, T.K. y Dickerson, J.W. (1974).** "Inter-relationships of nutrition and the metabolism of drugs". *Chem Biol Interact* 8 (3): 193-206.
- Bates, C.J. (1983).** "Vitamin A in pregnancy and lactation". *Proc Nutr Soc* 42 (1): 65-79.
- Baumeister, H.; Kreuzer, O.J.; Roosterman, D.; Schafer, J. y Meyerhof, W. (1998).** "Cloning, expression, pharmacology and tissue distribution of the mouse somatostatin receptor subtype 5". *J Neuroendocrinol* 10 (4): 283-290.
- Baumeister, H. y Meyerhof, W. (2000).** "Gene regulation of somatostatin receptors in rats". *J Physiol Paris* 94 (3-4): 167-177.
- Baumeister, H.; Wegner, M.; Richter, D. y Meyerhof, W. (2000).** "Dual regulation of somatostatin receptor subtype 1 gene expression by pit-1 in anterior pituitary GH3 cells". *Mol Endocrinol* 14 (2): 255-271.
- Beard, R.L.; Klein, E.S.; Standeven, A.M.; Escobar, M. y Chandraratna, R.A. (2001).** "Phenylcyclohexene and phenylcyclohexadiene substituted compounds having retinoid antagonist activity". *Bioorg Med Chem Lett* 11 (6): 765-768.
- Beaumont, V.; Hepworth, M.B.; Luty, J.S.; Kelly, E. y Henderson, G. (1998).** "Somatostatin receptor desensitization in NG108-15 cells. A consequence of receptor sequestration". *J Biol Chem* 273 (50): 33174-33183.
- Beczowska, I.W.; Buck, J. y Inturrisi, C.E. (1996).** "Retinoic acid-induced increase in delta-opioid receptor and N-methyl-D-aspartate receptor mRNA levels in neuroblastoma x glioma (NG108-15) cells". *Brain Res Bull* 39 (3): 193-199.
- Bell, J.R.; Young, M.R.; Masterman, S.C.; Morris, A.; Mattick, R.P. y Bammer, G. (1999).** "A pilot study of naltrexone-accelerated detoxification in opioid dependence". *Med J Aust* 171 (1): 26-30.



- Bellovino, D.; Apreda, M.; Gragnoli, S.; Massimi, M. y Gaetani, S. (2003). "Vitamin A transport: in vitro models for the study of RBP secretion". *Mol Aspects Med* 24 (6): 411-420.
- Benjannet, S.; Rhainds, D.; Essalmani, R.; Mayne, J.; Wickham, L.; Jin, W.; Asselin, M.C.; Hamelin, J.; Varret, M.; Allard, D.; Trillard, M.; Abifadel, M.; Tebon, A.; Attie, A.D.; Rader, D.J.; Boileau, C.; Brissette, L.; Chretien, M.; Prat, A. y Seidah, N.G. (2004). "NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol". *J Biol Chem* 279 (47): 48865-48875.
- Benov, L. (2001). "How superoxide radical damages the cell". *Protoplasma* 217 (1-3): 33-36.
- Berlett, B.S. y Stadtman, E.R. (1997). "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress". *J Biol Chem* 272 (33): 20313-20316.
- Berman, D.M. y Gilman, A.G. (1998). "Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate". *J Biol Chem* 273 (3): 1269-1272.
- Bernabéu, R.; Yang, T.; Xie, Y.; Mehta, B.; Ma, S.Y. y Longo, F.M. (2006). "Downregulation of the LAR protein tyrosine phosphatase receptor is associated with increased dentate gyrus neurogenesis and an increased number of granule cell layer neurons". *Mol Cell Neurosci* 31 (4): 723-738.
- Berne, R.M. y Levy, M.N. (2006). *Fisiología*. Madrid [etc.], Elsevier.
- Berridge, M.J. (1993). "Inositol trisphosphate and calcium signalling". *Nature* 361 (6410): 315-325.
- Biesalski, H.K. y Nohr, D. (2003). "Importance of vitamin-A for lung function and development". *Mol Aspects Med* 24 (6): 431-440.
- Bigley, R.; Stankova, L.; Roos, D. y Loos, J. (1980). "Glutathione-dependent dehydroascorbate reduction: a determinant of dehydroascorbate uptake by human polymorphonuclear leukocytes". *Enzyme* 25 (3): 200-204.
- Bjorneboe, A.; Bjorneboe, G.E. y Drevon, C.A. (1990). "Absorption, transport and distribution of vitamin E". *J Nutr* 120 (3): 233-242.
- Blanc, A.; Pandey, N.R. y Srivastava, A.K. (2003). "Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease (review)". *Int J Mol Med* 11 (2): 229-234.
- Blaner, W.S.; Obunike, J.C.; Kurlandsky, S.B.; al-Haideri, M.; Piantedosi, R.; Deckelbaum, R.J. y Goldberg, I.J. (1994). "Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells". *J Biol Chem* 269 (24): 16559-16565.
- Bliss, T.V. y Lomo, T. (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path". *J Physiol* 232 (2): 331-356.
- Bliss, T.V. y Collingridge, G.L. (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus". *Nature* 361 (6407): 31-39.
- Blomhoff, R.; Norum, K.R. y Berg, T. (1985). "Hepatic uptake of [<sup>3</sup>H]retinol bound to the serum retinol binding protein involves both parenchymal and perisinusoidal stellate cells". *J Biol Chem* 260 (25): 13571-13575.
- Blomhoff, R.; Green, M.H.; Green, J.B.; Berg, T. y Norum, K.R. (1991). "Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage". *Physiol Rev* 71 (4): 951-990.





- Blomhoff, H.K.; Smeland, E.B.; Erikstein, B.; Rasmussen, A.M.; Skrede, B.; Skjonsberg, C. y Blomhoff, R. (1992).** "Vitamin A is a key regulator for cell growth, cytokine production, and differentiation in normal B cells". *J Biol Chem* 267 (33): 23988-23992.
- Blomhoff, R. (1994).** "Transport and metabolism of vitamin A". *Nutr Rev* 52 (2 Pt 2): S13-23.
- Bonet, M.L.; Ribot, J.; Felipe, F. y Palou, A. (2003).** "Vitamin A and the regulation of fat reserves". *Cell Mol Life Sci* 60 (7): 1311-1321.
- Borek, C. (2004).** "Dietary antioxidants and human cancer". *Integr Cancer Ther* 3 (4): 333-341.
- Boscoboinik, D.; Szewczyk, A.; Hensey, C. y Azzi, A. (1991a).** "Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C". *J Biol Chem* 266 (10): 6188-6194.
- Boscoboinik, D.; Szewczyk, A. y Azzi, A. (1991b).** "Alpha-tocopherol (vitamin E) regulates vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity". *Arch Biochem Biophys* 286 (1): 264-269.
- Bourdel-Marchasson, I.; Delmas-Beauvieux, M.C.; Peuchant, E.; Richard-Harston, S.; Decamps, A.; Reignier, B.; Emeriau, J.P. y Rainfray, M. (2001).** "Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients". *Age Ageing* 30 (3): 235-241.
- Bouyer, K.; Faivre-Bauman, A.; Robinson, I.C.; Epelbaum, J. y Loudes, C. (2008).** "Sexually dimorphic distribution of sst2A receptors on growth hormone-releasing hormone neurones in mice: modulation by gonadal steroids". *J Neuroendocrinol* 20 (11): 1278-1287.
- Bradford, A.; Atkinson, J.; Fuller, N. y Rand, R.P. (2003).** "The effect of vitamin E on the structure of membrane lipid assemblies". *J Lipid Res* 44 (10): 1940-1945.
- Bramley, P.M.; Elmabda, I.; Kafatos, A.; Kelly, F.J.; Manios, Y.; Roxborough, H.E.; Schuch, W.; Sheepy, P.J.A. y Wagner, K.H. (2000).** "Vitamin E (A review)". *J Sci Food Agric* 80: 913-938.
- Brandt, D.R. y Ross, E.M. (1985).** "GTPase activity of the stimulatory GTP-binding regulatory protein of adenylate cyclase, Gs. Accumulation and turnover of enzyme-nucleotide intermediates". *J Biol Chem* 260 (1): 266-272.
- Brandt, D.T.; Goerke, A.; Heuer, M.; Gimona, M.; Leitges, M.; Kremmer, E.; Lammers, R.; Haller, H. y Mischak, H. (2003).** "Protein kinase C delta induces Src kinase activity via activation of the protein tyrosine phosphatase PTP alpha". *J Biol Chem* 278 (36): 34073-34078.
- Brasselet, S.; Guillen, S.; Vincent, J.P. y Mazella, J. (2002).** "Beta-arrestin is involved in the desensitization but not in the internalization of the somatostatin receptor 2A expressed in CHO cells". *FEBS Lett* 516 (1-3): 124-128.
- Brazeau, P.; Vale, W.; Burgus, R.; Ling, N.; Butcher, M.; Rivier, J. y Guillemin, R. (1973).** "Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone". *Science* 179 (68): 77-79.
- Brigelius-Flohé, R. y Traber, M.G. (1999).** "Vitamin E: function and metabolism". *Faseb J* 13 (10): 1145-1155.
- Brigelius-Flohé, R.; Kelly, F.J.; Salonen, J.T.; Neuzil, J.; Zingg, J.M. y Azzi, A. (2002).** "The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research". *Am J Clin Nutr* 76 (4): 703-716.



- Brigelius-Flohé, R. (2005).** "Introductory remarks to the new series of reviews: from dietary antioxidants to regulators in cellular signalling and gene expression". *Free Radic Res* 39 (4): 351.
- Brown, M.; Rivier, J. y Vale, W. (1977).** "Somatostatin: analogs with selected biological activities". *Science* 196 (4297): 1467-1469.
- Browne, S.E.; Ferrante, R.J. y Beal, M.F. (1999).** "Oxidative stress in Huntington's disease". *Brain Pathol* 9 (1): 147-163.
- Bruno, J.F.; Xu, Y.; Song, J. y Berelowitz, M. (1992).** "Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor". *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (23): 11151-11155.
- Bruno, J.F.; Xu, Y.; Song, J. y Berelowitz, M. (1993).** "Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat". *Endocrinology* 133 (6): 2561-2567.
- Bruno, J.F.; Xu, Y.; Song, J. y Berelowitz, M. (1994).** "Pituitary and hypothalamic somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in the food-deprived and diabetic rat". *Endocrinology* 135 (5): 1787-1792.
- Burgos-Ramos, E.; Hervás-Aguilar, A.; Puebla-Jiménez, L.; Boyano-Adánez, M.C. y Arilla-Ferreiro, E. (2007).** "Chronic but not acute intracerebroventricular administration of amyloid beta-peptide(25-35) decreases somatostatin content, adenylate cyclase activity, somatostatin-induced inhibition of adenylate cyclase activity, and adenylate cyclase I levels in the rat hippocampus". *J Neurosci Res* 85 (2): 433-442.
- Burton, K.A.; Kabigting, E.B.; Clifton, D.K. y Steiner, R.A. (1992).** "Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid distribution in the adult male rat brain and its colocalization in hypothalamic somatostatin neurons". *Endocrinology* 131 (2): 958-963.
- Butterfield, D.A.; Drake, J.; Pocernich, C. y Castegna, A. (2001).** "Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide". *Trends Mol Med* 7 (12): 548-554.
- Butterfield, D.A. y Kanski, J. (2001).** "Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins". *Mech Ageing Dev* 122 (9): 945-962.
- Butterfield, D.A.; Castegna, A.; Drake, J.; Scapagnini, G. y Calabrese, V. (2002).** "Vitamin E and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress". *Nutr Neurosci* 5 (4): 229-239.
- Cacabelos, R.; Niigawa, H.; Rodriguez-Arno, M.D.; Gómez-Pan, A. y Nishimura, T. (1988).** "Influence of somatostatin and growth hormone-releasing factor on behavior. Clinical and therapeutic implications in neuropsychiatric disorders". *Horm Res* 29 (2-3): 129-132.
- Cadenas, E.; Ginsberg, M.; Rabe, U. y Sies, H. (1984).** "Evaluation of alpha-tocopherol antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation as detected by low-level chemiluminescence". *Biochem J* 223 (3): 755-759.
- Calabrese, V.; Randazzo, G.; Ragusa, N. y Rizza, V. (1998).** "Long-term ethanol administration enhances age-dependent modulation of redox state in central and peripheral organs of rat: protection by metadoxine". *Drugs Exp Clin Res* 24 (2): 85-91.





- Calabrese, V.; Bates, T.E. y Stella, A.M. (2000).** "NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance". *Neurochem Res* 25 (9-10): 1315-1341.
- Cali, J.J.; Parekh, R.S. y Krupinski, J. (1996).** "Splice variants of type VIII adenylyl cyclase. Differences in glycosylation and regulation by  $Ca^{2+}$ /calmodulin". *J Biol Chem* 271 (2): 1089-1095.
- Calvert-Evers, J.L. y Hammond, K.D. (2002).** "Modification of oscillatory behaviour of protein tyrosine kinase and phosphatase during all-trans retinoic acid-induced differentiation of leukaemic cells". *Cell Biol Int* 26 (12): 1035-1042.
- Cant, S.H. y Pitcher, J.A. (2005).** "G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of ezrin is required for G protein-coupled receptor-dependent reorganization of the actin cytoskeleton". *Mol Biol Cell* 16 (7): 3088-3099.
- Cañón, E.; Cosgaya, J.M.; Scsucova, S. y Aranda, A. (2004).** "Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells". *Mol Biol Cell* 15 (12): 5583-5592.
- Capogna, M. (1998).** "Presynaptic facilitation of synaptic transmission in the hippocampus". *Pharmacol Ther* 77 (3): 203-223.
- Carman, C.V.; Parent, J.L.; Day, P.W.; Pronin, A.N.; Sternweis, P.M.; Wedegaertner, P.B.; Gilman, A.G.; Benovic, J.L. y Kozasa, T. (1999).** "Selective regulation of G $\alpha$ (q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2". *J Biol Chem* 274 (48): 34483-34492.
- Carroll, R.C.; Beattie, E.C.; Xia, H.; Luscher, C.; Altschuler, Y.; Nicoll, R.A.; Malenka, R.C. y von Zastrow, M. (1999).** "Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors". *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (24): 14112-14117.
- Castaño, A.; Herrera, A.J.; Cano, J. y Machado, A. (1993).** "Effects of a short period of vitamin E-deficient diet in the turnover of different neurotransmitters in substantia nigra and striatum of the rat". *Neuroscience* 53 (1): 179-185.
- Challem, J. (1997).** "The Past, Present and Future of Vitamins". *The Nutrition Reporter*.
- Chambon, P. (1996).** "A decade of molecular biology of retinoic acid receptors". *Faseb J* 10 (9): 940-954.
- Chandra, V.; Jasti, J.; Kaur, P.; Betzel, C.; Srinivasan, A. y Singh, T.P. (2002).** "First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A2 by alpha-tocopherol (vitamin E) and its implications in inflammation: crystal structure of the complex formed between phospholipase A2 and alpha-tocopherol at 1.8 Å resolution". *J Mol Biol* 320 (2): 215-222.
- Chaudiere, J. y Ferrari-Iliou, R. (1999).** "Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms". *Food Chem Toxicol* 37 (9-10): 949-962.
- Chen, L.; Fitzpatrick, V.D.; Vandlen, R.L. y Tashjian, A.H., Jr. (1997).** "Both overlapping and distinct signaling pathways for somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2 in pituitary cells". *J Biol Chem* 272 (30): 18666-18672.
- Chen, L. y Tashjian, A.H., Jr. (1999).** "Identification of distinct signalling pathways for somatostatin receptors SSTR1 and SSTR2 as revealed by microphysiometry". *Cell Signal* 11 (7): 499-505.
- Chen, H.; Fantel, A.G. y Juchau, M.R. (2000).** "Catalysis of the 4-hydroxylation of retinoic acids by cyp3a7 in human fetal hepatic tissues". *Drug Metab Dispos* 28 (9): 1051-1057.



- Chen, N. y Napoli, J.L. (2008).** "All-trans-retinoic acid stimulates translation and induces spine formation in hippocampal neurons through a membrane-associated RARalpha". *Faseb J* 22 (1): 236-245.
- Chevalleyre, V. y Castillo, P.E. (2004).** "Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus". *Neuron* 43 (6): 871-881.
- Chevalleyre, V.; Takahashi, K.A. y Castillo, P.E. (2006).** "Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS". *Annu Rev Neurosci* 29: 37-76.
- Chew, B.P. (1993).** "Effects of supplemental beta-carotene and vitamin A on reproduction in swine". *J Anim Sci* 71 (1): 247-252.
- Chiang, M.Y.; Misner, D.; Kempermann, G.; Schikorski, T.; Giguere, V.; Sucov, H.M.; Gage, F.H.; Stevens, C.F. y Evans, R.M. (1998).** "An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression". *Neuron* 21 (6): 1353-1361.
- Chini, B. y Parenti, M. (2004).** "G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there?" *J Mol Endocrinol* 32 (2): 325-338.
- Chiu, H.J.; Fischman, D.A. y Hammerling, U. (2008).** "Vitamin A depletion causes oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and PARP-1-dependent energy deprivation". *Faseb J* 22 (11): 3878-3887.
- Cho, S.; Chung, J.J.; Choe, Y.; Choi, H.S.; Han Kim, D.; Rhee, K. y Kim, K. (2001).** "A functional retinoic acid response element (RARE) is present within the distal promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene". *Brain Res Mol Brain Res* 87 (2): 204-213.
- Cho, W. y Stahelin, R.V. (2005).** "Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking". *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34: 119-151.
- Choi, E.J.; Xia, Z. y Storm, D.R. (1992).** "Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin". *Biochemistry* 31 (28): 6492-6498.
- Chow, C.K.; Ibrahim, W.; Wei, Z. y Chan, A.C. (1999).** "Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation". *Free Radic Biol Med* 27 (5-6): 580-587.
- Chuang, T.T.; LeVine, H., 3rd y De Blasi, A. (1995).** "Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C". *J Biol Chem* 270 (31): 18660-18665.
- Ciaroni, S.; Cuppini, R.; Cecchini, T.; Ferri, P.; Ambrogini, P.; Cuppini, C. y Del Grande, P. (1999).** "Neurogenesis in the adult rat dentate gyrus is enhanced by vitamin E deficiency". *J Comp Neurol* 411 (3): 495-502.
- Citri, A. y Malenka, R.C. (2008).** "Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms". *Neuropsychopharmacology* 33 (1): 18-41.
- Clagett-Dame, M. y DeLuca, H.F. (2002).** "The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development". *Annu Rev Nutr* 22: 347-381.
- Clark, R.B.; Kunkel, M.W.; Friedman, J.; Goka, T.J. y Johnson, J.A. (1988).** "Activation of cAMP-dependent protein kinase is required for heterologous desensitization of adenylyl cyclase in S49 wild-type lymphoma cells". *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (5): 1442-1446.
- Cocco, S.; Diaz, G.; Stancampiano, R.; Diana, A.; Carta, M.; Curreli, R.; Sarais, L. y Fadda, F. (2002).** "Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats". *Neuroscience* 115 (2): 475-482.



- Colás, B.; Cambillau, C.; Buscail, L.; Zeggari, M.; Esteve, J.P.; Lautre, V.; Thomas, F.; Vaysse, N. y Susini, C. (1992). "Stimulation of a membrane tyrosine phosphatase activity by somatostatin analogues in rat pancreatic acinar cells". *Eur J Biochem* 207 (3): 1017-1024.
- Cong, M.; Perry, S.J.; Lin, F.T.; Fraser, I.D.; Hu, L.A.; Chen, W.; Pitcher, J.A.; Scott, J.D. y Lefkowitz, R.J. (2001). "Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79". *J Biol Chem* 276 (18): 15192-15199.
- Connolly, T.; Rapiejko, P.J. y Gilmore, R. (1991). "Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor". *Science* 252 (5010): 1171-1173.
- Cooper, P.E.; Fernstrom, M.H.; Rorstad, O.P.; Leeman, S.E. y Martin, J.B. (1981). "The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain". *Brain Res* 218 (1-2): 219-232.
- Cooper, D.M.; Karpen, J.W.; Fagan, K.A. y Mons, N.E. (1998). "Ca(2+)-sensitive adenylyl cyclases". *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 32: 23-51.
- Crandall, J.; Sakai, Y.; Zhang, J.; Koul, O.; Mineur, Y.; Crusio, W.E. y McCaffery, P. (2004). "13-cis-retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice". *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (14): 5111-5116.
- Cronin, M.J.; Rogol, A.D.; Myers, G.A. y Hewlett, E.L. (1983). "Pertussis toxin blocks the somatostatin-induced inhibition of growth hormone release and adenosine 3',5'-monophosphate accumulation". *Endocrinology* 113 (1): 209-215.
- Csaba, Z. y Dournaud, P. (2001). "Cellular biology of somatostatin receptors". *Neuropeptides* 35 (1): 1-23.
- Csaba, Z.; Pirker, S.; Lelouvier, B.; Simon, A.; Videau, C.; Epelbaum, J.; Czech, T.; Baumgartner, C.; Sperk, G. y Dournaud, P. (2005). "Somatostatin receptor type 2 undergoes plastic changes in the human epileptic dentate gyrus". *J Neuropathol Exp Neurol* 64 (11): 956-969.
- Cunnick, J.M.; Dorsey, J.F.; Standley, T.; Turkson, J.; Kraker, A.J.; Fry, D.W.; Jove, R. y Wu, J. (1998). "Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway". *J Biol Chem* 273 (23): 14468-14475.
- Cuppini, R.; Ciaroni, S.; Cecchini, T.; Ambrogini, P.; Ferri, P.; Del Grande, P. y Papa, S. (2001). "Alpha-tocopherol controls cell proliferation in the adult rat dentate gyrus". *Neurosci Lett* 303 (3): 198-200.
- Davie, J.R. y Spencer, V.A. (2001). "Signal transduction pathways and the modification of chromatin structure". *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 65: 299-340.
- Davies, M.J. (2005). "The oxidative environment and protein damage". *Biochim Biophys Acta* 1703 (2): 93-109.
- Davila, M.E.; Norris, L.; Cleary, M.P. y Ross, A.C. (1985). "Vitamin A during lactation: relationship of maternal diet to milk vitamin A content and to the vitamin A status of lactating rats and their pups". *J Nutr* 115 (8): 1033-1041.
- Davis, R.J. (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases". *Cell* 103 (2): 239-252.
- de los Frailes, M.T.; Sánchez-Franco, F.; Lorenzo, M.J.; Fernández Vázquez, G. y Cacicedo, L. (1990). "Depolarizing influences regulate somatostatin synthesis and processing in cultured cerebral cortical cells". *Regul Pept* 27 (1): 97-105.



- de Oliveira, M.R.; de Bittencourt Pasquali, M.A.; Silvestrin, R.B.; Mello, E.S.T. y Moreira, J.C. (2007). "Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs locomotory and exploratory activity of adult rats". *Brain Res* 1169: 112-119.
- de Vos, S.; Dawson, M.I.; Holden, S.; Le, T.; Wang, A.; Cho, S.K.; Chen, D.L. y Koeffler, H.P. (1997). "Effects of retinoid X receptor-selective ligands on proliferation of prostate cancer cells". *Prostate* 32 (2): 115-121.
- De Zeeuw, C.I. y Yeo, C.H. (2005). "Time and tide in cerebellar memory formation". *Curr Opin Neurobiol* 15 (6): 667-674.
- Debier, C.; Pomeroy, P.P.; Thome, J.P.; Mignolet, E.; de Tillesse, T. y Larondelle, Y. (2004). "An unexpected parallelism between Vitamin A and PCBs in seal milk". *Aquat Toxicol* 68 (2): 179-183.
- Debier, C. y Larondelle, Y. (2005). "Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring". *Br J Nutr* 93 (2): 153-174.
- Debier, C. (2007). "Vitamin E during pre- and postnatal periods". *Vitam Horm* 76: 357-373.
- Deisseroth, A. y Dounce, A.L. (1970). "Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role". *Physiol Rev* 50 (3): 319-375.
- Dekker, L.V. y Parker, P.J. (1997). "Regulated binding of the protein kinase C substrate GAP-43 to the V0/C2 region of protein kinase C-delta". *J Biol Chem* 272 (19): 12747-12753.
- Delumeau, J.C.; Marin, P.; Tence, M.; Cordier, J.; Glowinski, J. y Premont, J. (1992). "Synergistic regulation of cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration by somatostatin and alpha 1-adrenergic agonists in mouse astrocytes". *J Physiol Paris* 86 (1-3): 31-38.
- Demchyshyn, L.L.; Srikant, C.B.; Sunahara, R.K.; Kent, G.; Seeman, P.; Van Tol, H.H.; Panetta, R.; Patel, Y.C. y Niznik, H.B. (1993). "Cloning and expression of a human somatostatin-14-selective receptor variant (somatostatin receptor 4) located on chromosome 20". *Mol Pharmacol* 43 (6): 894-901.
- Dent, P.; Wang, Y.; Gu, Y.Z.; Wood, S.L.; Reardon, D.B.; Mangués, R.; Pellicer, A.; Schonbrunn, A. y Sturgill, T.W. (1997). "S49 cells endogenously express subtype 2 somatostatin receptors which couple to increase protein tyrosine phosphatase activity in membranes and down-regulate Raf-1 activity in situ". *Cell Signal* 9 (7): 539-549.
- Denu, J.M. y Tanner, K.G. (1998). "Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation". *Biochemistry* 37 (16): 5633-5642.
- Devaraj, S. y Jialal, I. (1999). "Alpha-tocopherol decreases interleukin-1 beta release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (4): 1125-1133.
- Dhariwal, A.P.; Krulich, L.; Katz, S.H. y McCann, S.M. (1965). "Purification of growth hormone-releasing factor". *Endocrinology* 77 (5): 932-936.
- Djordjijevic, D.; Zhang, J.; Priam, M.; Viollet, C.; Gourdjji, D.; Kordon, C. y Epelbaum, J. (1998). "Effect of 17beta-estradiol on somatostatin receptor expression and inhibitory effects on growth hormone and prolactin release in rat pituitary cell cultures". *Endocrinology* 139 (5): 2272-2277.
- Doherty, P.; Fruns, M.; Seaton, P.; Dickson, G.; Barton, C.H.; Sears, T.A. y Walsh, F.S. (1990). "A threshold effect of the major isoforms of NCAM on neurite outgrowth". *Nature* 343 (6257): 464-466.



- Dohlman, H.G.; Thorner, J.; Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1991). "Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors". *Annu Rev Biochem* 60: 653-688.
- Dong, D.; Ruuska, S.E.; Levinthal, D.J. y Noy, N. (1999). "Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid". *J Biol Chem* 274 (34): 23695-23698.
- Donnelly, P.S.; Xiao, Z. y Wedd, A.G. (2007). "Copper and Alzheimer's disease". *Curr Opin Chem Biol* 11 (2): 128-133.
- Douglas, R.M. y Goddard, G.V. (1975). "Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus". *Brain Res* 86 (2): 205-215.
- Dudek, S.M. y Bear, M.F. (1992). "Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade". *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (10): 4363-4367.
- During, A. y Harrison, E.H. (2004). "Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture". *Arch Biochem Biophys* 430 (1): 77-88.
- Dutar, P.; Vaillend, C.; Violette, C.; Billard, J.M.; Potier, B.; Carlo, A.S.; Ungerer, A. y Epelbaum, J. (2002). "Spatial learning and synaptic hippocampal plasticity in type 2 somatostatin receptor knock-out mice". *Neuroscience* 112 (2): 455-466.
- Dworet, J.H. y Meinkoth, J.L. (2006). "Interference with 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein stimulates apoptosis through aberrant cell cycle progression and checkpoint activation". *Mol Endocrinol* 20 (5): 1112-1120.
- Ehlers, M.D. (2000). "Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting". *Neuron* 28 (2): 511-525.
- Eicher, S.D.; Morrill, J.L.; Blecha, F.; Chitko-McKown, C.G.; Anderson, N.V. y Higgins, J.J. (1994). "Leukocyte functions of young dairy calves fed milk replacers supplemented with vitamins A and E". *J Dairy Sci* 77 (5): 1399-1407.
- Elorza, A.; Penela, P.; Sarnago, S. y Mayor, F., Jr. (2003). "MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2". *J Biol Chem* 278 (31): 29164-29173.
- Epelbaum, J.; Tapia Arancibia, L.; Kordon, C. y Enjalbert, A. (1982). "Characterization, regional distribution, and subcellular distribution of  $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{11}$ -somatostatin binding sites in rat brain". *J Neurochem* 38 (6): 1515-1523.
- Epelbaum, J. (1992). "Intrahypothalamic neurohormonal interactions in the control of growth hormone secretion". *Ciba Found Symp* 168: 54-64; discussion 64-58.
- Eppler, C.M.; Zysk, J.R.; Corbett, M. y Shieh, H.M. (1992). "Purification of a pituitary receptor for somatostatin. The utility of biotinylated somatostatin analogs". *J Biol Chem* 267 (22): 15603-15612.
- Erdtmann-Vourliotis, M.; Mayer, P.; Ammon, S.; Riechert, U. y Holtt, V. (2001). "Distribution of G-protein-coupled receptor kinase (GRK) isoforms 2, 3, 5 and 6 mRNA in the rat brain". *Brain Res Mol Brain Res* 95 (1-2): 129-137.
- Eskild, W.; Simard, J.; Hansson, V. y Guerin, S.L. (1994). "Binding of a member of the NF1 family of transcription factors to two distinct cis-acting elements in the promoter and 5'-flanking region of the human cellular retinol binding protein 1 gene". *Mol Endocrinol* 8 (6): 732-745.





- Etchamendy, N.; Enderlin, V.; Marighetto, A.; Vouimba, R.M.; Pallet, V.; Jaffard, R. y Higuieret, P. (2001). "Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling". *J Neurosci* 21 (16): 6423-6429.
- Etchamendy, N.; Enderlin, V.; Marighetto, A.; Pallet, V.; Higuieret, P. y Jaffard, R. (2003). "Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling". *Behav Brain Res* 145 (1-2): 37-49.
- Evans, H.M. y Bishop, K.S. (1922). "On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction". *Science* 56 (1458): 650-651.
- Evans, H.M. y Long, J.A. (1922). "Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance". *Proc Natl Acad Sci U S A* 8 (3): 38-39.
- Evans, H.M.; Emerson, O.H. y Emerson, G.A. (1936). "The isolation from wheat germ oil of an alcohol, [alpha]-tocopherol, having the properties of vitamin E". *J Biol Chem* 113: 319-332.
- Evans, H.M. (1962). "The pioneer history of vitamin E". *Vitam Hormon* 20: 379-387.
- Feissner, R.F.; Skalska, J.; Gaum, W.E. y Sheu, S.S. (2009). "Crosstalk signaling between mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and ROS". *Front Biosci* 14: 1197-1218.
- Fenton, H.J.H. (1894). "Oxidation of tartaric acid in presence of iron". *J Chem Soc* 65: 899-911.
- Ferjoux, G.; Lopez, F.; Esteve, J.P.; Ferrand, A.; Vivier, E.; Vely, F.; Saint-Laurent, N.; Pradayrol, L.; Buscail, L. y Susini, C. (2003). "Critical role of Src and SHP-2 in sst2 somatostatin receptor-mediated activation of SHP-1 and inhibition of cell proliferation". *Mol Biol Cell* 14 (9): 3911-3928.
- Ferrer-Alcón, M.; La Harpe, R. y García-Sevilla, J.A. (2004). "Decreased immunodensities of micro-opioid receptors, receptor kinases GRK 2/6 and beta-arrestin-2 in postmortem brains of opiate addicts". *Brain Res Mol Brain Res* 121 (1-2): 114-122.
- Ferri, P.; Cecchini, T.; Ciaroni, S.; Ambrogini, P.; Cuppini, R.; Santi, S.; Benedetti, S.; Pagliarani, S.; Del Grande, P. y Papa, S. (2003). "Vitamin E affects cell death in adult rat dentate gyrus". *J Neurocytol* 32 (9): 1155-1164.
- Ferri, P.; Cecchini, T.; Ambrogini, P.; Betti, M.; Cuppini, R.; Del Grande, P. y Ciaroni, S. (2006). "alpha-Tocopherol affects neuronal plasticity in adult rat dentate gyrus: the possible role of PKCdelta". *J Neurobiol* 66 (8): 793-810.
- Fierabracci, A.; Castagna, M. y Baschieri, L. (1993). "Calcitonin and somatostatin containing C cells in rat and human thyroid. Immunohistochemical study by a double-staining method". *Pathologica* 85 (1099): 467-474.
- Finkbeiner, S. (2000). "CREB couples neurotrophin signals to survival messages". *Neuron* 25 (1): 11-14.
- Florio, T.; Scorziello, A.; Thellung, S.; Salzano, S.; Berlingieri, M.T.; Fusco, A. y Schettini, G. (1997). "Oncogene transformation of PC Cl3 clonal thyroid cell line induces an autonomous pattern of proliferation that correlates with a loss of basal and stimulated phosphotyrosine phosphatase activity". *Endocrinology* 138 (9): 3756-3763.
- Florio, T.; Yao, H.; Carey, K.D.; Dillon, T.J. y Stork, P.J. (1999). "Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1)". *Mol Endocrinol* 13 (1): 24-37.



- Florio, T.; Thellung, S.; Arena, S.; Corsaro, A.; Bajetto, A.; Schettini, G. y Stork, P.J. (2000).** "Somatostatin receptor 1 (SSTR1)-mediated inhibition of cell proliferation correlates with the activation of the MAP kinase cascade: role of the phosphotyrosine phosphatase SHP-2". *J Physiol Paris* 94 (3-4): 239-250.
- Florio, T.; Arena, S.; Thellung, S.; Iuliano, R.; Corsaro, A.; Massa, A.; Pattarozzi, A.; Bajetto, A.; Trapasso, F.; Fusco, A. y Schettini, G. (2001).** "The activation of the phosphotyrosine phosphatase eta (r-PTP eta) is responsible for the somatostatin inhibition of PC Cl3 thyroid cell proliferation". *Mol Endocrinol* 15 (10): 1838-1852.
- Florio, T. (2008a).** "Molecular mechanisms of the antiproliferative activity of somatostatin receptors (SSTRs) in neuroendocrine tumors". *Front Biosci* 13: 822-840.
- Florio, T. (2008b).** "Somatostatin/somatostatin receptor signalling: phosphotyrosine phosphatases". *Mol Cell Endocrinol* 286 (1-2): 40-48.
- Flower, D.R. (2000).** "Beyond the superfamily: the lipocalin receptors". *Biochim Biophys Acta* 1482 (1-2): 327-336.
- Floyd, R.A. (1999).** "Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders". *Proc Soc Exp Biol Med* 222 (3): 236-245.
- Ford, C.E.; Skiba, N.P.; Bae, H.; Daaka, Y.; Reuveny, E.; Shekter, L.R.; Rosal, R.; Weng, G.; Yang, C.S.; Iyengar, R.; Miller, R.J.; Jan, L.Y.; Lefkowitz, R.J. y Hamm, H.E. (1998).** "Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors". *Science* 280 (5367): 1271-1274.
- Franco Mdo, C.; Akamine, E.H.; Aparecida de Oliveira, M.; Fortes, Z.B.; Tostes, R.C.; Carvalho, M.H. y Nigro, D. (2003).** "Vitamins C and E improve endothelial dysfunction in intrauterine-undernourished rats by decreasing vascular superoxide anion concentration". *J Cardiovasc Pharmacol* 42 (2): 211-217.
- Freedman, J.E.; Farhat, J.H.; Loscalzo, J. y Keane, J.F., Jr. (1996).** "alpha-tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism". *Circulation* 94 (10): 2434-2440.
- Fridovich, I. (1995).** "Superoxide radical and superoxide dismutases". *Annu Rev Biochem* 64: 97-112.
- Fukui, K.; Onodera, K.; Shinkai, T.; Suzuki, S. y Urano, S. (2001).** "Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems". *Ann N Y Acad Sci* 928: 168-175.
- Funk, C. (1911).** "On the chemical nature of the substance which cures polyneuritis in birds induced by a diet of polished rice". *J Physiol* 43 (5): 395-400.
- Funk, C. (1912).** "The etiology of the deficiency diseases. Beri-beri, polyneuritis en birds, epidemic dropsy, scurvy, experimental scurvy in animals, infantil scurvy, ship beri-beri, pellagra". *J State Med* 20: 341-368.
- Furuta, M.; Yano, H.; Zhou, A.; Rouille, Y.; Holst, J.J.; Carroll, R.; Ravazzola, M.; Orci, L.; Furuta, H. y Steiner, D.F. (1997).** "Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2". *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (13): 6646-6651.
- Gaetani, G.F.; Ferraris, A.M.; Rolfo, M.; Mangerini, R.; Arena, S. y Kirkman, H.N. (1996).** "Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes". *Blood* 87 (4): 1595-1599.
- Gainetdinov, R.R.; Premont, R.T.; Bohn, L.M.; Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. (2004).** "Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions". *Annu Rev Neurosci* 27: 107-144.



- Gallagher, S.M.; Daly, C.A.; Bear, M.F. y Huber, K.M. (2004).** "Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal area CA1". *J Neurosci* 24 (20): 4859-4864.
- García, M.A.; Vázquez, J.; Giménez, C.; Valdivieso, F. y Zafra, F. (1996).** "Transcription factor AP-2 regulates human apolipoprotein E gene expression in astrocytoma cells". *J Neurosci* 16 (23): 7550-7556.
- García, M.A.; Campillos, M.; Marina, A.; Valdivieso, F. y Vázquez, J. (1999).** "Transcription factor AP-2 activity is modulated by protein kinase A-mediated phosphorylation". *FEBS Lett* 444 (1): 27-31.
- Garland, A.; Fowler, C.J.; Alafuzoff, I.; Winblad, B. y Cowburn, R.F. (1992).** "Neurotransmitter-mediated inhibition of post-mortem human brain adenylyl cyclase". *J Neural Transm Gen Sect* 87 (2): 113-124.
- Garrett, B.; Finsen, B. y Wree, A. (1994).** "Parcellation of cortical areas by in situ hybridization for somatostatin mRNA in the adult rat: frontal, parietal, occipital, and temporal regions". *Anat Embryol (Berl)* 190 (4): 389-398.
- Gatica, L.; Álvarez, S.; Gómez, N.; Zago, M.P.; Oteiza, P.; Oliveros, L. y Giménez, M.S. (2005).** "Vitamin A deficiency induces prooxidant environment and inflammation in rat aorta". *Free Radic Res* 39 (6): 621-628.
- Gavrieli, Y.; Sherman, Y. y Ben-Sasson, S.A. (1992).** "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation". *J Cell Biol* 119 (3): 493-501.
- Gaykema, R.P.; Gaal, G.; Traber, J.; Hersh, L.B. y Luiten, P.G. (1991).** "The basal forebrain cholinergic system: efferent and afferent connectivity and long-term effects of lesions". *Acta Psychiatr Scand Suppl* 366: 14-26.
- Gerster, H. (1997).** "Vitamin A--functions, dietary requirements and safety in humans". *Int J Vitam Nutr Res* 67 (2): 71-90.
- Gianni, M.; Tarrade, A.; Nigro, E.A.; Garattini, E. y Rochette-Egly, C. (2003).** "The AF-1 and AF-2 domains of RAR gamma 2 and RXR alpha cooperate for triggering the transactivation and the degradation of RAR gamma 2/RXR alpha heterodimers". *J Biol Chem* 278 (36): 34458-34466.
- Giap, B.T.; Jong, C.N.; Ricker, J.H.; Cullen, N.K. y Zafonte, R.D. (2000).** "The hippocampus: anatomy, pathophysiology, and regenerative capacity". *J Head Trauma Rehabil* 15 (3): 875-894.
- Giard, D.J.; Aaronson, S.A.; Todaro, G.J.; Arnstein, P.; Kersey, J.H.; Dosik, H. y Parks, W.P. (1973).** "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors". *J Natl Cancer Inst* 51 (5): 1417-1423.
- Gills, J.J. y Dennis, P.A. (2004).** "The development of phosphatidylinositol ether lipid analogues as inhibitors of the serine/threonine kinase, Akt". *Expert Opin Investig Drugs* 13 (7): 787-797.
- Gilman, A.G. (1987).** "G proteins: transducers of receptor-generated signals". *Annu Rev Biochem* 56: 615-649.
- Gimeno, A.; Zaragoza, R.; Viña, J.R. y Miralles, V.J. (2004).** "Vitamin E activates CRABP-II gene expression in cultured human fibroblasts, role of protein kinase C". *FEBS Lett* 569 (1-3): 240-244.
- Glowinski, J. y Iversen, L.L. (1966).** "Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [<sup>3</sup>H]norepinephrine, [<sup>3</sup>H]dopamine and [<sup>3</sup>H]dopa in various regions of the brain". *J Neurochem* 13 (8): 655-669.





- González, G.A. y Montminy, M.R. (1989).** "Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133". *Cell* 59 (4): 675-680.
- González-Guijarro, L.; López-Ruiz, M.P.; Prieto, J.C. y Arilla, E. (1986).** "Modulation of somatostatin binding sites in cytosol of rabbit gastric fundic mucosa by cysteamine administration". *Gen Pharmacol* 17 (6): 637-639.
- Goodman, D.S. (1984).** "Overview of current knowledge of metabolism of vitamin A and carotenoids". *J Natl Cancer Inst* 73 (6): 1375-1379.
- Goodman, A.B. (1998).** "Three independent lines of evidence suggest retinoids as causal to schizophrenia". *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (13): 7240-7244.
- Goodman, A.B. y Pardee, A.B. (2003).** "Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (5): 2901-2905.
- Goti, D.; Balazs, Z.; Panzenboeck, U.; Hrzenjak, A.; Reicher, H.; Wagner, E.; Zechner, R.; Malle, E. y Sattler, W. (2002).** "Effects of lipoprotein lipase on uptake and transcytosis of low density lipoprotein (LDL) and LDL-associated alpha-tocopherol in a porcine in vitro blood-brain barrier model". *J Biol Chem* 277 (32): 28537-28544.
- Gracanin, M. y Davies, M.J. (2007).** "Inhibition of protein tyrosine phosphatases by amino acid, peptide, and protein hydroperoxides: potential modulation of cell signaling by protein oxidation products". *Free Radic Biol Med* 42 (10): 1543-1551.
- Granot, E.; Tamir, I. y Deckelbaum, R.J. (1988).** "Neutral lipid transfer protein does not regulate alpha-tocopherol transfer between human plasma lipoproteins". *Lipids* 23 (1): 17-21.
- Grant, M.; Patel, R.C. y Kumar, U. (2004).** "The role of subtype-specific ligand binding and the C-tail domain in dimer formation of human somatostatin receptors". *J Biol Chem* 279 (37): 38636-38643.
- Greco, A.; Minghetti, L. y Levi, G. (2000).** "Isoprostanes, novel markers of oxidative injury, help understanding the pathogenesis of neurodegenerative diseases". *Neurochem Res* 25 (9-10): 1357-1364.
- Green, M.H. y Green, J.B. (1994).** "Vitamin A intake and status influence retinol balance, utilization and dynamics in rats". *J Nutr* 124 (12): 2477-2485.
- Greenwood, F.C.; Hunter, W.M. y Glover, J.S. (1963).** "The Preparation of <sup>131</sup>I-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity". *Biochem J* 89: 114-123.
- Greenwood, M.T.; Panetta, R.; Robertson, L.A.; Liu, J.L. y Patel, Y.C. (1994).** "Sequence analysis of the 5'-flanking promoter region of the human somatostatin receptor 5". *Biochem Biophys Res Commun* 205 (3): 1883-1890.
- Greenwood, M.T.; Robertson, L.A. y Patel, Y.C. (1995).** "Cloning of the gene encoding human somatostatin receptor 2: sequence analysis of the 5'-flanking promoter region". *Gene* 159 (2): 291-292.
- Griffith, O.W. (1980).** "Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine". *Anal Biochem* 106 (1): 207-212.
- Griminger, P. (1972).** "Casimir Funk--a biographical sketch (1884-1967)". *J Nutr* 102 (9): 1105-1113.
- Gromada, J.; Hoy, M.; Buschard, K.; Salehi, A. y Rorsman, P. (2001).** "Somatostatin inhibits exocytosis in rat pancreatic alpha-cells by G(i2)-dependent activation of calcineurin and depriving of secretory granules". *J Physiol* 535 (Pt 2): 519-532.
- Grossman, S. y Waksman, E.G. (1984).** "New aspects of the inhibition of soybean lipoxygenase by alpha-tocopherol. Evidence for the existence of a specific complex". *Int J Biochem* 16 (3): 281-289.



- Guillou, J.L.; Micheau, J. y Jaffard, R. (1998).** "The opposite effects of cysteamine on the acquisition of two different tasks in mice are associated with bidirectional testing-induced changes in hippocampal adenylyl cyclase activity". *Behav Neurosci* 112 (4): 900-908.
- Gundlfinger, A.; Kapfhammer, J.P.; Kruse, F.; Leitges, M. y Metzger, F. (2003).** "Different regulation of Purkinje cell dendritic development in cerebellar slice cultures by protein kinase Calpha and -beta". *J Neurobiol* 57 (1): 95-109.
- Haase, H. y Maret, W. (2005).** "Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants". *Biometals* 18 (4): 333-338.
- Haber, F. y Weiss, J. (1932).** "Uber die Katalyse des Hydroperoxydes". *Naturwissenschaften* 20: 948-950.
- Hallé, M.; Tremblay, M.L. y Meng, T.C. (2007).** "Protein tyrosine phosphatases: emerging regulators of apoptosis". *Cell Cycle* 6 (22): 2773-2781.
- Hannon, J.P.; Petrucci, C.; Fehlmann, D.; Viollet, C.; Epelbaum, J. y Hoyer, D. (2002).** "Somatostatin sst2 receptor knock-out mice: localisation of sst1-5 receptor mRNA and binding in mouse brain by semi-quantitative RT-PCR, in situ hybridisation histochemistry and receptor autoradiography". *Neuropharmacology* 42 (3): 396-413.
- Harman, D. (1981).** "The aging process". *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (11): 7124-7128.
- Haroutunian, V.; Kanof, P.D. y Davis, K.L. (1989).** "Interactions of forebrain cholinergic and somatostatinergic systems in the rat". *Brain Res* 496 (1-2): 98-104.
- Hashemi, S.H.; Li, J.Y.; Ahlman, H. y Dahlstrom, A. (2003).** "SSR2(a) receptor expression and adrenergic/cholinergic characteristics in differentiated SH-SY5Y cells". *Neurochem Res* 28 (3-4): 449-460.
- Hatley, M.E.; Lockless, S.W.; Gibson, S.K.; Gilman, A.G. y Ranganathan, R. (2003).** "Allosteric determinants in guanine nucleotide-binding proteins". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (24): 14445-14450.
- Hattori, S.; Hattori, Y.; Banba, N.; Kasai, K. y Shimoda, S. (1995).** "Pentamethylhydroxychromane, vitamin E derivative, inhibits induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide". *Biochem Mol Biol Int* 35 (1): 177-183.
- Hauser, F.; Meyerhof, W.; Wulfsen, I.; Schonrock, C. y Richter, D. (1994).** "Sequence analysis of the promoter region of the rat somatostatin receptor subtype 1 gene". *FEBS Lett* 345 (2-3): 225-228.
- Heller, R.; Werner-Felmayer, G. y Werner, E.R. (2004).** "alpha-Tocopherol and endothelial nitric oxide synthesis". *Ann N Y Acad Sci* 1031: 74-85.
- Hendriks, W.J.; Elson, A.; Harroch, S. y Stoker, A.W. (2008).** "Protein tyrosine phosphatases: functional inferences from mouse models and human diseases". *Febs J* 275 (5): 816-830.
- Herrera, E. y Barbas, C. (2001).** "Vitamin E: action, metabolism and perspectives". *J Physiol Biochem* 57 (2): 43-56.
- Hervás-Aguilar, A.; Puebla-Jiménez, L.; Burgos-Ramos, E.; Aguado-Llera, D. y Arilla-Ferreiro, E. (2005).** "Effects of single and continuous administration of amyloid beta-peptide (25-35) on adenylyl cyclase activity and the somatostatinergic system in the rat frontal and parietal cortex". *Neuroscience* 135 (1): 181-190.
- Hildreth, K.L.; Wu, J.H.; Barak, L.S.; Exum, S.T.; Kim, L.K.; Peppel, K. y Freedman, N.J. (2004).** "Phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor-beta by G protein-coupled receptor kinase-2 reduces receptor signaling and interaction with the Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor". *J Biol Chem* 279 (40): 41775-41782.



- Hipkin, R.W.; Wang, Y. y Schonbrunn, A. (2000).** "Protein kinase C activation stimulates the phosphorylation and internalization of the sst2A somatostatin receptor". *J Biol Chem* 275 (8): 5591-5599.
- Hirose, T.; Apfel, R.; Pfahl, M. y Jetten, A.M. (1995).** "The orphan receptor TAK1 acts as a repressor of RAR-, RXR- and T3R-mediated signaling pathways". *Biochem Biophys Res Commun* 211 (1): 83-91.
- Hokfelt, T.; Efendic, S.; Hellerstrom, C.; Johansson, O.; Luft, R. y Arimura, A. (1975).** "Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special references to the A1-cells of the pancreatic islets and to the hypothalamus". *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 200: 5-41.
- Honda, K.; Smith, M.A.; Zhu, X.; Baus, D.; Merrick, W.C.; Tartakoff, A.M.; Hattier, T.; Harris, P.L.; Siedlak, S.L.; Fujioka, H.; Liu, Q.; Moreira, P.I.; Miller, F.P.; Nunomura, A.; Shimohama, S. y Perry, G. (2005).** "Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized by bound redox-active iron". *J Biol Chem* 280 (22): 20978-20986.
- Hortala, M.; Ferjoux, G.; Estival, A.; Bertrand, C.; Schulz, S.; Pradayrol, L.; Susini, C. y Clemente, F. (2003).** "Inhibitory role of the somatostatin receptor SST2 on the intracrine-regulated cell proliferation induced by the 210-amino acid fibroblast growth factor-2 isoform: implication of JAK2". *J Biol Chem* 278 (23): 20574-20581.
- Horvat, A.; Schwaiger, F.; Hager, G.; Brocker, F.; Streif, R.; Knyazev, P.; Ullrich, A. y Kreutzberg, G.W. (2001).** "A novel role for protein tyrosine phosphatase shp1 in controlling glial activation in the normal and injured nervous system". *J Neurosci* 21 (3): 865-874.
- Hosomi, A.; Arita, M.; Sato, Y.; Kiyose, C.; Ueda, T.; Igarashi, O.; Arai, H. y Inoue, K. (1997).** "Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs". *FEBS Lett* 409 (1): 105-108.
- Hou, C.; Gilbert, R.L. y Barber, D.L. (1994).** "Subtype-specific signaling mechanisms of somatostatin receptors SSTR1 and SSTR2". *J Biol Chem* 269 (14): 10357-10362.
- Hrabetova, S. y Sacktor, T.C. (1996).** "Bidirectional regulation of protein kinase M zeta in the maintenance of long-term potentiation and long-term depression". *J Neurosci* 16 (17): 5324-5333.
- Hu, H. (2000).** "Polysialic acid regulates chain formation by migrating olfactory interneuron precursors". *J Neurosci Res* 61 (5): 480-492.
- Huang, C.C. y Hsu, K.S. (2006).** "Sustained activation of metabotropic glutamate receptor 5 and protein tyrosine phosphatases mediate the expression of (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine-induced long-term depression in the hippocampal CA1 region". *J Neurochem* 96 (1): 179-194.
- Huang, H.S.; Ma, M.C. y Chen, J. (2009).** "Low-vitamin E diet exacerbates calcium oxalate crystal formation via enhanced oxidative stress in rat hyperoxaluric kidney". *Am J Physiol Renal Physiol* 296 (1): F34-45.
- Hukovic, N.; Panetta, R.; Kumar, U. y Patel, Y.C. (1996).** "Agonist-dependent regulation of cloned human somatostatin receptor types 1-5 (hSSTR1-5): subtype selective internalization or upregulation". *Endocrinology* 137 (9): 4046-4049.
- Hukovic, N.; Rocheville, M.; Kumar, U.; Sasi, R.; Khare, S. y Patel, Y.C. (1999).** "Agonist-dependent up-regulation of human somatostatin receptor type 1 requires molecular signals in the cytoplasmic C-tail". *J Biol Chem* 274 (35): 24550-24558.
- Hull, P.R. y D'Arcy, C. (2003).** "Isotretinoin use and subsequent depression and suicide: presenting the evidence". *Am J Clin Dermatol* 4 (7): 493-505.



- Hurley, J.H. y Misra, S. (2000).** "Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains". *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 49-79.
- Husson, M.; Enderlin, V.; Alfos, S.; Feart, C.; Higuieret, P. y Pallet, V. (2003).** "Triiodothyronine administration reverses vitamin A deficiency-related hypo-expression of retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptors and of neurogranin in rat brain". *Br J Nutr* 90 (1): 191-198.
- Ichitani, Y.; Okaichi, H.; Yoshikawa, T. y Ibata, Y. (1992).** "Learning behaviour in chronic vitamin E-deficient and -supplemented rats: radial arm maze learning and passive avoidance response". *Behav Brain Res* 51 (2): 157-164.
- Inanami, O.; Shiga, A.; Okada, K.; Sato, R.; Miyake, Y. y Kuwabara, M. (1999).** "Lipid peroxides and antioxidants in serum of neonatal calves". *Am J Vet Res* 60 (4): 452-457.
- Íñiguez, M.A.; Morte, B.; Rodríguez-Pena, A.; Muñoz, A.; Gerendasy, D.; Sutcliffe, J.G. y Bernal, J. (1994).** "Characterization of the promoter region and flanking sequences of the neuron-specific gene RC3 (neurogranin)". *Brain Res Mol Brain Res* 27 (2): 205-214.
- Iwami, G.; Kawabe, J.; Ebina, T.; Cannon, P.J.; Homcy, C.J. y Ishikawa, Y. (1995).** "Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A". *J Biol Chem* 270 (21): 12481-12484.
- Izquierdo-Claros, R.M.; Boyano-Adánez, M.C.; Torrecillas, G.; Rodríguez-Puyol, M. y Arilla-Ferreiro, E. (2001).** "Acute modulation of somatostatin receptor function by melatonin in the rat frontoparietal cortex". *J Pineal Res* 31 (1): 46-56.
- Izquierdo-Claros, R.M.; Boyano-Adánez, M.C. y Arilla-Ferreiro, E. (2004).** "Activity of the hippocampal somatostatinergic system following daily administration of melatonin". *Brain Res Mol Brain Res* 126 (2): 107-113.
- Jacquin, T.; Champagnat, J.; Madamba, S.; Denavit-Saubie, M. y Siggins, G.R. (1988).** "Somatostatin depresses excitability in neurons of the solitary tract complex through hyperpolarization and augmentation of IM, a non-inactivating voltage-dependent outward current blocked by muscarinic agonists". *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (3): 948-952.
- Jain, S.K. (1989).** "The neonatal erythrocyte and its oxidative susceptibility". *Semin Hematol* 26 (4): 286-300.
- Jain, S.K.; Wise, R. y Bocchini, J.J., Jr. (1996).** "Vitamin E and vitamin E-quinone levels in red blood cells and plasma of newborn infants and their mothers". *J Am Coll Nutr* 15 (1): 44-48.
- Jaiswal, B.S. y Conti, M. (2003).** "Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (19): 10676-10681.
- James, R.A.; Sarapura, V.D.; Bruns, C.; Raulf, F.; Dowding, J.M.; Gordon, D.F.; Wood, W.M. y Ridgway, E.C. (1997).** "Thyroid hormone-induced expression of specific somatostatin receptor subtypes correlates with involution of the TtT-97 murine thyrotrope tumor". *Endocrinology* 138 (2): 719-724.
- Jiang, Q.; Elson-Schwab, I.; Courtemanche, C. y Ames, B.N. (2000).** "gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (21): 11494-11499.





- Jiang, Q.; Christen, S.; Shigenaga, M.K. y Ames, B.N. (2001).** "gamma-tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention". *Am J Clin Nutr* 74 (6): 714-722.
- Johansson, O.; Hokfelt, T. y Elde, R.P. (1984).** "Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat". *Neuroscience* 13 (2): 265-339.
- Joseph, J.A.; Shukitt-Hale, B.; Denisova, N.A.; Prior, R.L.; Cao, G.; Martin, A.; Taghialatela, G. y Bickford, P.C. (1998).** "Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits". *J Neurosci* 18 (19): 8047-8055.
- Kagimoto, S.; Yamada, Y.; Kubota, A.; Someya, Y.; Ihara, Y.; Yasuda, K.; Kozasa, T.; Imura, H.; Seino, S. y Seino, Y. (1994).** "Human somatostatin receptor, SSTR2, is coupled to adenylyl cyclase in the presence of Gi alpha 1 protein". *Biochem Biophys Res Commun* 202 (2): 1188-1195.
- Kamenetsky, M.; Middelhaufe, S.; Bank, E.M.; Levin, L.R.; Buck, J. y Steegborn, C. (2006).** "Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems". *J Mol Biol* 362 (4): 623-639.
- Kandel, E.R. y Tauc, L. (1965).** "Mechanism of heterosynaptic facilitation in the giant cell of the abdominal ganglion of *Aplysia depilans*". *J Physiol* 181 (1): 28-47.
- Kandel, E.R.; Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (2001).** *Principios de neurociencia*. Madrid, McGraw-Hill Interamericana.
- Kandel, E. (2005).** "Eric Kandel: the future of memory". *Mol Interv* 5 (2): 65-69.
- Karrer, P. y Helfenstein, A. (1930).** "Pflanzenfarbstoffe XVII. Über die Natur der Carotinoide im Schaf-und Kuhkot". *Helv Chim Acta* 13 (1): 86-87.
- Kashif, S.M.; Zaidi, R. y Banu, N. (2003).** "Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain". *Clin Chim Acta* 340 (1-2): 229-233.
- Kastner, P.; Messaddeq, N.; Mark, M.; Wendling, O.; Grondona, J.M.; Ward, S.; Ghyselinck, N. y Chambon, P. (1997).** "Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes". *Development* 124 (23): 4749-4758.
- Kawaguchi, R.; Yu, J.; Honda, J.; Hu, J.; Whitelegge, J.; Ping, P.; Wiita, P.; Bok, D. y Sun, H. (2007).** "A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A". *Science* 315 (5813): 820-825.
- Kehrl, J.H. (1998).** "Heterotrimeric G protein signaling: roles in immune function and fine-tuning by RGS proteins". *Immunity* 8 (1): 1-10.
- Kelly, E.; Bailey, C.P. y Henderson, G. (2008).** "Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization". *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S379-388.
- Kelner, M.J.; Bagnell, R. y Welch, K.J. (1990).** "Thioureas react with superoxide radicals to yield a sulfhydryl compound. Explanation for protective effect against paraquat". *J Biol Chem* 265 (3): 1306-1311.
- Kempermann, G.; Wiskott, L. y Gage, F.H. (2004).** "Functional significance of adult neurogenesis". *Curr Opin Neurobiol* 14 (2): 186-191.
- Kerr, J.F. (2002).** "History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept". *Toxicology* 181-182: 471-474.
- Kim, B.C.; Ryu, Y.C.; Cho, Y.J. y Rhee, M.S. (2006).** "Influence of dietary alpha-tocopheryl acetate supplementation on cholesterol oxidation in retail packed chicken meat during refrigerated storage". *Biosci Biotechnol Biochem* 70 (4): 808-814.



- Kimura, N.; Tomizawa, S.; Arai, K.N. y Kimura, N. (1998).** "Chronic treatment with estrogen up-regulates expression of sst2 messenger ribonucleic acid (mRNA) but down-regulates expression of sst5 mRNA in rat pituitaries". *Endocrinology* 139 (4): 1573-1580.
- Kinjo, K.; Sandoval, S.; Sakamoto, K.M. y Shankar, D.B. (2005).** "The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis". *Cell Cycle* 4 (9): 1134-1135.
- Kleuss, C.; Hescheler, J.; Ewel, C.; Rosenthal, W.; Schultz, G. y Wittig, B. (1991).** "Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents". *Nature* 353 (6339): 43-48.
- Kluxen, F.W.; Bruns, C. y Lubbert, H. (1992).** "Expression cloning of a rat brain somatostatin receptor cDNA". *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (10): 4618-4622.
- Knight, J.A. (2000).** "The biochemistry of aging". *Adv Clin Chem* 35: 1-62.
- Ko, K.C. y Paradise, R.R. (1970).** "The effects of substrates on rat atria depressed with bicarbonate-free medium, citrate, or low calcium". *Proc Soc Exp Biol Med* 134 (2): 469-476.
- Ko, K.C. y Paradise, R.R. (1971).** "Nature of endogenous substrates used to support contractility of isolated rat atria". *Proc Soc Exp Biol Med* 137 (3): 928-931.
- Kohler, C. y Chan-Palay, V. (1982).** "Somatostatin-like immunoreactive neurons in the hippocampus: an immunocytochemical study in the rat". *Neurosci Lett* 34 (3): 259-264.
- Kohout, T.A. y Lefkowitz, R.J. (2003).** "Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization". *Mol Pharmacol* 63 (1): 9-18.
- Kolleck, I.; Schlame, M.; Fechner, H.; Looman, A.C.; Wissel, H. y Rustow, B. (1999).** "HDL is the major source of vitamin E for type II pneumocytes". *Free Radic Biol Med* 27 (7-8): 882-890.
- Kong, J.L.; Panetta, R.; Song, W.; Somerville, W. y Greenwood, M.T. (2002).** "Inhibition of somatostatin receptor 5-signaling by mammalian regulators of G-protein signaling (RGS) in yeast". *Biochim Biophys Acta* 1542 (1-3): 95-105.
- Kontush, A.; Mann, U.; Arlt, S.; Ujeyl, A.; Luhrs, C.; Muller-Thomsen, T. y Beisiegel, U. (2001).** "Influence of vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer's disease". *Free Radic Biol Med* 31 (3): 345-354.
- Kops, G.J. y Burgering, B.M. (1999).** "Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling". *J Mol Med* 77 (9): 656-665.
- Kozasa, T.; Kaziro, Y.; Ohtsuka, T.; Grigg, J.J.; Nakajima, S. y Nakajima, Y. (1996).** "G protein specificity of the muscarine-induced increase in an inward rectifier potassium current in AtT-20 cells". *Neurosci Res* 26 (3): 289-297.
- Kramer, D.; Caruso, A.; Nicoletti, F. y Genazzani, A.A. (2005).** "Somatostatin and the somatostatin receptor 2 are reciprocally controlled by calcineurin during cerebellar granule cell maturation". *J Neurochem* 94 (5): 1374-1383.
- Krantic, S.; Mechawar, N.; Reix, S. y Quirion, R. (2005).** "Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration". *Trends Neurosci* 28 (12): 670-676.
- Krasel, C.; Dammeier, S.; Winstel, R.; Brockmann, J.; Mischak, H. y Lohse, M.J. (2001).** "Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin". *J Biol Chem* 276 (3): 1911-1915.
- Kraus, J.; Woltje, M. y Holtt, V. (1999).** "Regulation of mouse somatostatin receptor type 2 gene expression by glucocorticoids". *FEBS Lett* 459 (2): 200-204.



- Kraus, J.; Woltje, M.; Schonwetter, N. y Holtt, V. (2000).** "Gene structure and regulation of the somatostatin receptor type 2". *J Physiol Paris* 94 (3-4): 199-204.
- Kreienkamp, H.J.; Honck, H.H. y Richter, D. (1997).** "Coupling of rat somatostatin receptor subtypes to a G-protein gated inwardly rectifying potassium channel (GIRK1)". *FEBS Lett* 419 (1): 92-94.
- Kreienkamp, H.J.; Roth, A. y Richter, D. (1998).** "Rat somatostatin receptor subtype 4 can be made sensitive to agonist-induced internalization by mutation of a single threonine (residue 331)". *DNA Cell Biol* 17 (10): 869-878.
- Kreitzer, A.C. y Malenka, R.C. (2005).** "Dopamine modulation of state-dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum". *J Neurosci* 25 (45): 10537-10545.
- Kreuzer, O.J.; Krisch, B.; Dery, O.; Bunnett, N.W. y Meyerhof, W. (2001).** "Agonist-mediated endocytosis of rat somatostatin receptor subtype 3 involves beta-arrestin and clathrin coated vesicles". *J Neuroendocrinol* 13 (3): 279-287.
- Krezel, W.; Kastner, P. y Chambon, P. (1999).** "Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system". *Neuroscience* 89 (4): 1291-1300.
- Krisko, A.; Piantanida, I.; Kveder, M. y Pifat, G. (2004).** "Analysis of beta-carotene absorbance for studying structural properties of human plasma low-density lipoproteins". *Anal Biochem* 331 (1): 177-182.
- Krulich, L.; Dhariwal, A.P. y McCann, S.M. (1968).** "Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro". *Endocrinology* 83 (4): 783-790.
- Kubota, A.; Yamada, Y.; Kagimoto, S.; Yasuda, K.; Someya, Y.; Ihara, Y.; Okamoto, Y.; Kozasa, T.; Seino, S. y Seino, Y. (1994).** "Multiple effector coupling of somatostatin receptor subtype SSTR1". *Biochem Biophys Res Commun* 204 (1): 176-186.
- Kurokawa, R.; DiRenzo, J.; Boehm, M.; Sugarman, J.; Gloss, B.; Rosenfeld, M.G.; Heyman, R.A. y Glass, C.K. (1994).** "Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding". *Nature* 371 (6497): 528-531.
- Kuwabara, M.; Asanuma, T.; Niwa, K. y Inanami, O. (2008).** "Regulation of cell survival and death signals induced by oxidative stress". *J Clin Biochem Nutr* 43 (2): 51-57.
- Lachowicz, A.; Pawlikowski, M. y Ochedalski, T. (1994).** "Somatostatin-14 increases the inositol-1,4,5-trisphosphate content in various areas of the brain". *Biochem Biophys Res Commun* 203 (1): 379-384.
- Lahlou, H.; Saint-Laurent, N.; Esteve, J.P.; Eychene, A.; Pradayrol, L.; Pyronnet, S. y Susini, C. (2003).** "sst2 Somatostatin receptor inhibits cell proliferation through Ras-, Rap1-, and B-Raf-dependent ERK2 activation". *J Biol Chem* 278 (41): 39356-39371.
- Lamb, T.D. y Pugh, E.N., Jr. (2004).** "Dark adaptation and the retinoid cycle of vision". *Prog Retin Eye Res* 23 (3): 307-380.
- Lane, M.A. y Bailey, S.J. (2005).** "Role of retinoid signalling in the adult brain". *Prog Neurobiol* 75 (4): 275-293.
- Langemann, H.; Kabiersch, A. y Newcombe, J. (1992).** "Measurement of low-molecular-weight antioxidants, uric acid, tyrosine and tryptophan in plaques and white matter from patients with multiple sclerosis". *Eur Neurol* 32 (5): 248-252.
- Lao, Y.S.; Hendley, E.D.; Felder, R.A. y Jose, P.A. (2002).** "Elevated renal cortical calmodulin-dependent protein kinase activity and blood pressure". *Clin Exp Hypertens* 24 (4): 289-300.



- Lappas, G.; Daou, G.B. y Anand-Srivastava, M.B. (2005).** "Oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gialpha proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats". *J Hypertens* 23 (12): 2251-2261.
- Larcher, A.; Neculcea, J.; Chu, K. y Zingg, H.H. (1995).** "Effects of retinoic acid and estrogens on oxytocin gene expression in the rat uterus: in vitro and in vivo studies". *Mol Cell Endocrinol* 114 (1-2): 69-76.
- Lauridsen, C.; Engel, H.; Jensen, S.K.; Craig, A.M. y Traber, M.G. (2002).** "Lactating sows and suckling piglets preferentially incorporate RRR- over all-rac-alpha-tocopherol into milk, plasma and tissues". *J Nutr* 132 (6): 1258-1264.
- Law, S.F.; Manning, D. y Reisine, T. (1991).** "Identification of the subunits of GTP-binding proteins coupled to somatostatin receptors". *J Biol Chem* 266 (27): 17885-17897.
- Law, S.F. y Reisine, T. (1992).** "Agonist binding to rat brain somatostatin receptors alters the interaction of the receptors with guanine nucleotide-binding regulatory proteins". *Mol Pharmacol* 42 (3): 398-402.
- Lee, S.C.; Kuan, C.Y.; Wen, Z.D. y Yang, S.D. (1998).** "The naturally occurring PKC inhibitor sphingosine and tumor promoter phorbol ester potentially induce tyrosine phosphorylation/activation of oncogenic proline-directed protein kinase FA/GSK-3alpha in a common signalling pathway". *J Protein Chem* 17 (1): 15-27.
- Lee, H.K.; Barbarosie, M.; Kameyama, K.; Bear, M.F. y Haganir, R.L. (2000).** "Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity". *Nature* 405 (6789): 955-959.
- Lee, K.S.; Lee, S.J.; Park, H.J.; Chung, J.P.; Han, K.H.; Chon, C.Y.; Lee, S.I. y Moon, Y.M. (2001).** "Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells". *Yonsei Med J* 42 (1): 1-8.
- Léger, C.L.; Dumontier, C.; Fouret, G.; Boulot, P. y Descomps, B. (1998).** "A short-term supplementation of pregnant women before delivery does not improve significantly the vitamin E status of neonates--low efficiency of the vitamin E placental transfer". *Int J Vitam Nutr Res* 68 (5): 293-299.
- Leranth, C. y Frotscher, M. (1987).** "Cholinergic innervation of hippocampal GAD- and somatostatin-immunoreactive commissural neurons". *J Comp Neurol* 261 (1): 33-47.
- Lewis, D.L.; Weight, F.F. y Luini, A. (1986).** "A guanine nucleotide-binding protein mediates the inhibition of voltage-dependent calcium current by somatostatin in a pituitary cell line". *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (23): 9035-9039.
- Li, X.C.; Carretero, O.A.; Shao, Y. y Zhuo, J.L. (2006).** "Glucagon receptor-mediated extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat mesangial cells: role of protein kinase A and phospholipase C". *Hypertension* 47 (3): 580-585.
- Li, L.; Yun, S.H.; Keblesh, J.; Trommer, B.L.; Xiong, H.; Radulovic, J. y Tourtellotte, W.G. (2007).** "Egr3, a synaptic activity regulated transcription factor that is essential for learning and memory". *Mol Cell Neurosci* 35 (1): 76-88.
- Li, Y.; Descorbeth, M. y Anand-Srivastava, M.B. (2008).** "Role of oxidative stress in high glucose-induced decreased expression of Gialpha proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294 (6): H2845-2854.
- Lieberman, S. y Bruning, N. (1997).** *The real vitamin & mineral book*. New York, Penguin Group USA.





- Lin, M.T. y Beal, M.F. (2006).** "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases". *Nature* 443 (7113): 787-795.
- Liu, J.L.; Papachristou, D.N. y Patel, Y.C. (1994).** "Glucocorticoids activate somatostatin gene transcription through co-operative interaction with the cyclic AMP signalling pathway". *Biochem J* 301 ( Pt 3): 863-869.
- Liu, M.; Yu, B.; Nakanishi, O.; Wieland, T. y Simon, M. (1997).** "The Ca<sup>2+</sup>-dependent binding of calmodulin to an N-terminal motif of the heterotrimeric G protein beta subunit". *J Biol Chem* 272 (30): 18801-18807.
- Liu, D.; Martino, G.; Thangaraju, M.; Sharma, M.; Halwani, F.; Shen, S.H.; Patel, Y.C. y Srikant, C.B. (2000).** "Caspase-8-mediated intracellular acidification precedes mitochondrial dysfunction in somatostatin-induced apoptosis". *J Biol Chem* 275 (13): 9244-9250.
- Liu, S.; Premont, R.T.; Kontos, C.D.; Zhu, S. y Rockey, D.C. (2005).** "A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension". *Nat Med* 11 (9): 952-958.
- Livera, G.; Rouiller-Fabre, V.; Pairault, C.; Levacher, C. y Habert, R. (2002).** "Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A". *Reproduction* 124 (2): 173-180.
- Lombardi, M.S.; Kavelaars, A.; Penela, P.; Scholtens, E.J.; Roccio, M.; Schmidt, R.E.; Schedlowski, M.; Mayor, F., Jr. y Heijnen, C.J. (2002).** "Oxidative stress decreases G protein-coupled receptor kinase 2 in lymphocytes via a calpain-dependent mechanism". *Mol Pharmacol* 62 (2): 379-388.
- Lonze, B.E. y Ginty, D.D. (2002).** "Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system". *Neuron* 35 (4): 605-623.
- López, F.; Esteve, J.P.; Buscail, L.; Delesque, N.; Saint-Laurent, N.; Theveniau, M.; Nahmias, C.; Vaysse, N. y Susini, C. (1997).** "The tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the sst2 somatostatin receptor and is an essential component of sst2-mediated inhibitory growth signaling". *J Biol Chem* 272 (39): 24448-24454.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951).** "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J Biol Chem* 193 (1): 265-275.
- Luini, A. y De Matteis, M.A. (1990).** "Evidence that receptor-linked G protein inhibits exocytosis by a post-second-messenger mechanism in AtT-20 cells". *J Neurochem* 54 (1): 30-38.
- Lynn, J.S. y Hughes, A.D. (2000).** "Phospholipase C Isoforms, Cytoskeletal Organization, and Vascular Smooth Muscle Differentiation". *News Physiol Sci* 15: 41-45.
- Maden, M. (1994).** "Vitamin A in embryonic development". *Nutr Rev* 52 (2 Pt 2): S3-12.
- Maden, M.; Gale, E. y Zile, M. (1998).** "The role of vitamin A in the development of the central nervous system". *J Nutr* 128 (2 Suppl): 471S-475S.
- Maden, M. (2002).** "Retinoid signalling in the development of the central nervous system". *Nat Rev Neurosci* 3 (11): 843-853.
- Magleby, K.L. y Zengel, J.E. (1982).** "A quantitative description of stimulation-induced changes in transmitter release at the frog neuromuscular junction". *J Gen Physiol* 80 (4): 613-638.
- Maksumova, L.; Le, H.T.; Muratkhodjaev, F.; Davidson, D.; Veillette, A. y Pallen, C.J. (2005).** "Protein tyrosine phosphatase alpha regulates Fyn activity and Cbp/PAG phosphorylation in thymocyte lipid rafts". *J Immunol* 175 (12): 7947-7956.
- Malenka, R.C. y Bear, M.F. (2004).** "LTP and LTD: an embarrassment of riches". *Neuron* 44 (1): 5-21.



- Malik, M.A.; Blusztajn, J.K. y Greenwood, C.E. (2000).** "Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: role of retinoic acid". *J Nutr Biochem* 11 (1): 2-13.
- Malm, D.; Giaever, A.; Vonen, B.; Burhol, P.G. y Florholmen, J. (1991).** "Somatostatin inhibition of phospholipase C activity in isolated rat pancreatic islets". *Acta Physiol Scand* 143 (4): 413-419.
- Mancillas, J.R.; Siggins, G.R. y Bloom, F.E. (1986).** "Somatostatin selectively enhances acetylcholine-induced excitations in rat hippocampus and cortex". *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (19): 7518-7521.
- Mancuso, M.; Coppede, F.; Migliore, L.; Siciliano, G. y Murri, L. (2006).** "Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration". *J Alzheimers Dis* 10 (1): 59-73.
- Mangelsdorf, D.J. (1994).** "Vitamin A receptors". *Nutr Rev* 52 (2 Pt 2): S32-44.
- Mangelsdorf, D.J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schutz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P. y Evans, R.M. (1995).** "The nuclear receptor superfamily: the second decade". *Cell* 83 (6): 835-839.
- Marcil, J.; Schiffrin, E.L. y Anand-Srivastava, M.B. (1996).** "Aberrant adenylyl cyclase/cAMP signal transduction and G protein levels in platelets from hypertensive patients improve with antihypertensive drug therapy". *Hypertension* 28 (1): 83-90.
- Mardones, P. y Rigotti, A. (2004).** "Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in alpha-tocopherol metabolism and potential implications for disease". *J Nutr Biochem* 15 (5): 252-260.
- Marill, J.; Idres, N.; Capron, C.C.; Nguyen, E. y Chabot, G.G. (2003).** "Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review". *Curr Drug Metab* 4 (1): 1-10.
- Marin, P.; Delumeau, J.C.; Tence, M.; Cordier, J.; Glowinski, J. y Premont, J. (1991).** "Somatostatin potentiates the alpha 1-adrenergic activation of phospholipase C in striatal astrocytes through a mechanism involving arachidonic acid and glutamate". *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (20): 9016-9020.
- Martin, K.C.; Casadio, A.; Zhu, H.; Yaping, E.; Rose, J.C.; Chen, M.; Bailey, C.H. y Kandel, E.R. (1997).** "Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage". *Cell* 91 (7): 927-938.
- Masaki, K.H.; Losonczy, K.G.; Izmirlian, G.; Foley, D.J.; Ross, G.W.; Petrovitch, H.; Havlik, R. y White, L.R. (2000).** "Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men". *Neurology* 54 (6): 1265-1272.
- Massa, A.; Barbieri, F.; Aiello, C.; Arena, S.; Pattarozzi, A.; Pirani, P.; Corsaro, A.; Iuliano, R.; Fusco, A.; Zona, G.; Spaziante, R.; Florio, T. y Schettini, G. (2004).** "The expression of the phosphotyrosine phosphatase DEP-1/PTPeta dictates the responsiveness of glioma cells to somatostatin inhibition of cell proliferation". *J Biol Chem* 279 (28): 29004-29012.
- Massaro, G.D. y Massaro, D. (2000).** "Retinoic acid treatment partially rescues failed septation in rats and in mice". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278 (5): L955-960.
- Matsuoka, N.; Kaneko, S. y Satoh, M. (1991).** "A facilitatory role of endogenous somatostatin in long-term potentiation of the mossy fiber-CA3 system in guinea-pig hippocampus". *Neurosci Lett* 129 (2): 177-180.
- Matsuoka, N.; Yamazaki, M. y Yamaguchi, I. (1995).** "Changes in brain somatostatin in memory-deficient rats: comparison with cholinergic markers". *Neuroscience* 66 (3): 617-626.



- Mattill, H.A. y Conklin, R.E. (1920).** "The nutritive properties of milk, with special reference to reproduction in the albino rat". *J Biol Chem* 44: 137-158.
- Mattill, H.A. y Stone, N.C. (1923).** "The nutritive properties of milk with special reference to reproduction in the albino rat. II". *J Biol Chem* 55: 443-452.
- Maurer, R.; Gaehwiler, B.H.; Buescher, H.H.; Hill, R.C. y Roemer, D. (1982).** "Opiate antagonistic properties of an octapeptide somatostatin analog". *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (15): 4815-4817.
- McCollum, E.V. y Davis, M. (1913).** "The necessity of certain lipins in the diet during growth". *J Biol Chem* 15: 167-175.
- McCollum, E.V.; Simmonds, N.; Becker, J.E. y Shipley, P.G. (1922).** "Studies on experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition". *J Biol Chem* 53: 293-312.
- McCollum, E.V. (1967).** "The paths to the discovery of vitamins A and D". *J Nutr* 91 (2): Suppl 1:11-16.
- McCord, J.M. y Fridovich, I. (1969).** "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)". *J Biol Chem* 244 (22): 6049-6055.
- McCudden, C.R.; Willard, F.S.; Kimple, R.J.; Johnston, C.A.; Hains, M.D.; Jones, M.B. y Siderovski, D.P. (2005).** "G alpha selectivity and inhibitor function of the multiple GoLoco motif protein GPSM2/LGN". *Biochim Biophys Acta* 1745 (2): 254-264.
- McCullough, F.S.; Northrop-Clewes, C.A. y Thurnham, D.I. (1999).** "The effect of vitamin A on epithelial integrity". *Proc Nutr Soc* 58 (2): 289-293.
- McDonald, S.G.; Crews, C.M.; Wu, L.; Driller, J.; Clark, R.; Erikson, R.L. y McCormick, F. (1993).** "Reconstitution of the Raf-1-MEK-ERK signal transduction pathway in vitro". *Mol Cell Biol* 13 (11): 6615-6620.
- McEwen, B.S. (1996).** "Gonadal and adrenal steroids regulate neurochemical and structural plasticity of the hippocampus via cellular mechanisms involving NMDA receptors". *Cell Mol Neurobiol* 16 (2): 103-116.
- McLaren, D.S. (1999).** "Vitamin A deficiency disorders". *J Indian Med Assoc* 97 (8): 320-323.
- McLean, L.D. (1958).** "Contrasting functions of limbic and neocortical systems of the brain and their relevance to psychophysiological aspects of medicine". *Amer J Med* 25 (4): 611-626.
- Medicine, I.O. (2000).** "Dietary reference intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids". *Food and Nutrition board*. Washington, DC, National Academy Press.
- Medicine, I.O. (2001).** "Dietary reference intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc". *Food and nutrition board*. Washington, DC, National Academy Press.
- Mehindate, K.; Sahlas, D.J.; Frankel, D.; Mawal, Y.; Liberman, A.; Corcos, J.; Dion, S. y Schipper, H.M. (2001).** "Proinflammatory cytokines promote glial heme oxygenase-1 expression and mitochondrial iron deposition: implications for multiple sclerosis". *J Neurochem* 77 (5): 1386-1395.
- Meister, A. (1994).** "Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals". *J Biol Chem* 269 (13): 9397-9400.
- Mendelsohn, C.; Batourina, E.; Fung, S.; Gilbert, T. y Dodd, J. (1999).** "Stromal cells mediate retinoid-dependent functions essential for renal development". *Development* 126 (6): 1139-1148.



- Mey, J. y McCaffery, P. (2004).** "Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates". *Neuroscientist* 10 (5): 409-421.
- Meydani, S.N. y Tangerdy, R.P. (1992).** "Vitamin E and immune response". *Vitamin E in health and disease*. L. Packer y J. Fuschs. New York, Marcel Dekker.
- Meyerhof, W. (1998).** "The elucidation of somatostatin receptor functions: a current view". *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 133: 55-108.
- Mic, F.A.; Molotkov, A.; Benbrook, D.M. y Duester, G. (2003).** "Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (12): 7135-7140.
- Michiels, C.; Raes, M.; Toussaint, O. y Remacle, J. (1994).** "Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress". *Free Radic Biol Med* 17 (3): 235-248.
- Miller, F.J., Jr.; Gutterman, D.D.; Rios, C.D.; Heistad, D.D. y Davidson, B.L. (1998).** "Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis". *Circ Res* 82 (12): 1298-1305.
- Minami, M. y Yoshikawa, H. (1979).** "A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use". *Clin Chim Acta* 92 (3): 337-342.
- Minucci, S.; Leid, M.; Toyama, R.; Saint-Jeannet, J.P.; Peterson, V.J.; Horn, V.; Ishmael, J.E.; Bhattacharyya, N.; Dey, A.; Dawid, I.B. y Ozato, K. (1997).** "Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependent gene expression". *Mol Cell Biol* 17 (2): 644-655.
- Misner, D.L.; Jacobs, S.; Shimizu, Y.; de Urquiza, A.M.; Solomin, L.; Perlmann, T.; De Luca, L.M.; Stevens, C.F. y Evans, R.M. (2001).** "Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity". *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (20): 11714-11719.
- Mitchell, B.L.; Ulrich, C.M. y McTiernan, A. (2003).** "Supplementation with vitamins or minerals and immune function: can the elderly benefit?". *Nutr Res* 23: 1117-1139.
- Møller, L.N.; Stidsen, C.E.; Hartmann, B. y Holst, J.J. (2003).** "Somatostatin receptors". *Biochim Biophys Acta* 1616 (1): 1-84.
- Monji, A.; Morimoto, N.; Okuyama, I.; Yamashita, N. y Tashiro, N. (1994).** "Effect of dietary vitamin E on lipofuscin accumulation with age in the rat brain". *Brain Res* 634 (1): 62-68.
- Monteil, C.; Marouillat, S.; Fillastre, J.P. y Morin, J.P. (1995).** "Effects of the medium HCO<sub>3</sub>-/CO<sub>2</sub> buffer system on differentiation and intermediary metabolism properties of rabbit proximal tubule cells in primary culture". *Epithelial Cell Biol* 4 (3): 131-139.
- Montine, K.S.; Quinn, J.F.; Zhang, J.; Fessel, J.P.; Roberts, L.J., 2nd; Morrow, J.D. y Montine, T.J. (2004).** "Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases". *Chem Phys Lipids* 128 (1-2): 117-124.
- Montminy, M.R.; Goodman, R.H.; Horovitch, S.J. y Habener, J.F. (1984).** "Primary structure of the gene encoding rat preprosomatostatin". *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (11): 3337-3340.
- Montminy, M.R. y Bilezikjian, L.M. (1987).** "Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene". *Nature* 328 (6126): 175-178.
- Montminy, M.; Brindle, P.; Arias, J.; Ferreri, K. y Armstrong, R. (1996).** "Regulation of somatostatin gene transcription by cAMP". *Adv Pharmacol* 36: 1-13.





- Moore, S.D.; Madamba, S.G.; Joels, M. y Siggins, G.R. (1988). "Somatostatin augments the M-current in hippocampal neurons". *Science* 239 (4837): 278-280.
- Morley, J.E.; Melmed, S.; Reed, A.; Kasson, B.G.; Levin, S.R.; Pekary, A.E. y Hershman, J.M. (1980). "Effect of vitamin A on the hypothalamo-pituitary-thyroid axis". *Am J Physiol* 238 (2): E174-179.
- Morris, M.C.; Beckett, L.A.; Scherr, P.A.; Hebert, L.E.; Bennett, D.A.; Field, T.S. y Evans, D.A. (1998). "Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of incident Alzheimer disease". *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12 (3): 121-126.
- Morris, M.C.; Evans, D.A.; Bienias, J.L.; Tangney, C.C. y Wilson, R.S. (2002). "Vitamin E and cognitive decline in older persons". *Arch Neurol* 59 (7): 1125-1132.
- Moult, P.R.; Gladding, C.M.; Sanderson, T.M.; Fitzjohn, S.M.; Bashir, Z.I.; Molnar, E. y Collingridge, G.L. (2006). "Tyrosine phosphatases regulate AMPA receptor trafficking during metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression". *J Neurosci* 26 (9): 2544-2554.
- Müller, U.; Roberts, M.P.; Engel, D.A.; Doerfler, W. y Shenk, T. (1989). "Induction of transcription factor AP-1 by adenovirus E1A protein and cAMP". *Genes Dev* 3 (12A): 1991-2002.
- Munteanu, A.; Zingg, J.M.; Ogru, E.; Libinaki, R.; Gianello, R.; West, S.; Negis, Y. y Azzi, A. (2004). "Modulation of cell proliferation and gene expression by alpha-tocopheryl phosphates: relevance to atherosclerosis and inflammation". *Biochem Biophys Res Commun* 318 (1): 311-316.
- Muñoz-Acedo, G.; Izquierdo-Claros, R.M.; Sánchez-Alonso, J.A.; del Hoyo, N.; Pérez-Albarsanz, M.A. y Arilla, E. (1995). "Effect of somatostatin on the mass accumulation of inositol-1,4,5-trisphosphate in rat hypothalamus, striatum, frontoparietal cortex and hippocampus". *Neurosci Lett* 197 (1): 41-44.
- Murray, E.D., Jr.; Wechter, W.J.; Kantoci, D.; Wang, W.H.; Pham, T.; Quiggle, D.D.; Gibson, K.M.; Leipold, D. y Anner, B.M. (1997). "Endogenous natriuretic factors 7: biospecificity of a natriuretic gamma-tocopherol metabolite LLU-alpha". *J Pharmacol Exp Ther* 282 (2): 657-662.
- Murthy, K.S.; Coy, D.H. y Makhlof, G.M. (1996). "Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle. Activation of phospholipase C-beta3 by Gbetagamma and inhibition of adenylyl cyclase by Galphai1 and Galphao". *J Biol Chem* 271 (38): 23458-23463.
- Nag, S. y Tang, F. (1998). "Cholinergic lesions of the rat brain by ibotenic acid and 192 IgG-saporin: effects on somatostatin, substance P and neuropeptide Y levels in the cerebral cortex and the hippocampus". *Neurosci Lett* 252 (2): 83-86.
- Nagayama, Y.; Tanaka, K.; Hara, T.; Namba, H.; Yamashita, S.; Taniyama, K. y Niwa, M. (1996). "Involvement of G protein-coupled receptor kinase 5 in homologous desensitization of the thyrotropin receptor". *J Biol Chem* 271 (17): 10143-10148.
- Nakagawa, S.; Kim, J.E.; Lee, R.; Malberg, J.E.; Chen, J.; Steffen, C.; Zhang, Y.J.; Nestler, E.J. y Duman, R.S. (2002). "Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein". *J Neurosci* 22 (9): 3673-3682.
- Negis, Y.; Zingg, J.M.; Ogru, E.; Gianello, R.; Libinaki, R. y Azzi, A. (2005). "On the existence of cellular tocopheryl phosphate, its synthesis, degradation and cellular roles: a hypothesis". *IUBMB Life* 57 (1): 23-25.



- Newaz, M.A.; Nawal, N.N.; Rohaizan, C.H.; Muslim, N. y Gapor, A. (1999). "alpha-Tocopherol increased nitric oxide synthase activity in blood vessels of spontaneously hypertensive rats". *Am J Hypertens* 12 (8 Pt 1): 839-844.
- Ng, M.H.; Choo, Y.M.; Ma, A.N.; Chuah, C.H. y Hashim, M.A. (2004). "Separation of vitamin E (tocopherol, tocotrienol, and tocomonoenol) in palm oil". *Lipids* 39 (10): 1031-1035.
- Niki, E. (1987). "Antioxidants in relation to lipid peroxidation". *Chem Phys Lipids* 44 (2-4): 227-253.
- Noy, N. y Xu, Z.J. (1990). "Interactions of retinol with binding proteins: implications for the mechanism of uptake by cells". *Biochemistry* 29 (16): 3878-3883.
- Oakley, R.H.; Laporte, S.A.; Holt, J.A.; Barak, L.S. y Caron, M.G. (2001). "Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*". *J Biol Chem* 276 (22): 19452-19460.
- O'Carroll, A.M.; Lolait, S.J.; Konig, M. y Mahan, L.C. (1992). "Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28". *Mol Pharmacol* 42 (6): 939-946.
- O'Carroll, A.M.; Raynor, K.; Lolait, S.J. y Reisine, T. (1994). "Characterization of cloned human somatostatin receptor SSTR5". *Mol Pharmacol* 46 (2): 291-298.
- Oehrlein, S.A.; Maelicke, A. y Herget, T. (1998). "Expression of protein kinase C gene family members is temporally and spatially regulated during neural development in vitro". *Eur J Cell Biol* 77 (4): 323-337.
- Offermanns, S. (2003). "G-proteins as transducers in transmembrane signalling". *Prog Biophys Mol Biol* 83 (2): 101-130.
- Ohno, M.; Shibata, S.; Yamamoto, T. y Watanabe, S. (1993). "Working memory deficits following muscarinic blockade combined with depletion of brain somatostatin in rats". *Brain Res* 610 (2): 348-353.
- Olcott, H.S. y Emerson, O.H. (1937). "Antioxidants and the autoxidation of fats IX. The antioxidant properties of the tocopherols". *J Am Chem Soc* 59: 1008-1009.
- Olias, G.; Viollet, C.; Kusserow, H.; Epelbaum, J. y Meyerhof, W. (2004). "Regulation and function of somatostatin receptors". *J Neurochem* 89 (5): 1057-1091.
- Oliveira, A.A.; Almeida, J.P.; Freitas, R.M.; Nascimento, V.S.; Aguiar, L.M.; Junior, H.V.; Fonseca, F.N.; Viana, G.S.; Sousa, F.C. y Fonteles, M.M. (2007). "Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures". *Cell Mol Neurobiol* 27 (3): 395-406.
- Oliveros, L.; Vega, V.; Anzulovich, A.C.; Ramírez, D. y Giménez, M.S. (2000). "Vitamin A deficiency modifies antioxidant defenses and essential element contents in heart". *Nutrition Res* 20 (8): 1139-1150.
- Olson, J.A. (1984). "Serum levels of vitamin A and carotenoids as reflectors of nutritional status". *J Natl Cancer Inst* 73 (6): 1439-1444.
- Ong, D.E. (1994). "Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins". *Nutr Rev* 52 (2 Pt 2): S24-31.
- Oomen, S.P.; Hofland, L.J.; Lamberts, S.W.; Lowenberg, B. y Touw, I.P. (2001). "Internalization-defective mutants of somatostatin receptor subtype 2 exert normal signaling functions in hematopoietic cells". *FEBS Lett* 503 (2-3): 163-167.



- Ortega, H.; Coperías, J.L.; Castilla, P.; Gómez-Coronado, D. y Lasunción, M.A. (2004).** "Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of different lipid-soluble antioxidants in human plasma and low-density lipoproteins". *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 803 (2): 249-255.
- Ortiz, M.A.; Piedrafita, F.J.; Pfahl, M. y Maki, R. (1995).** "TOR: a new orphan receptor expressed in the thymus that can modulate retinoid and thyroid hormone signals". *Mol Endocrinol* 9 (12): 1679-1691.
- Ostman, A.; Hellberg, C. y Bohmer, F.D. (2006).** "Protein-tyrosine phosphatases and cancer". *Nat Rev Cancer* 6 (4): 307-320.
- Ott, W.H.; Dickinson, A.M.; Van Inderstine, A.; Bazemore, A.W.; Page, A.C., Jr. y Folkers, K. (1958).** "Studies related to vitamin B13". *J Nutr* 64 (4): 525-531.
- Ottino, P. y Duncan, J.R. (1996).** "The role of adenylate cyclase, cAMP and PGE2 in the in vitro growth regulation of murine melanoma cells by vitamin E". *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 54 (5): 375-383.
- Ottolenghi, A. (1959).** "Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipides". *Arch Biochem Biophys* 79: 355-363.
- Packer, L. (1991).** "Protective role of vitamin E in biological systems". *Am J Clin Nutr* 53 (4 Suppl): 1050S-1055S.
- Pagano, M.; Clynes, M.A.; Masada, N.; Ciruela, A.; Ayling, L.J.; Wachten, S. y Cooper, D.M. (2009).** "Insights into the residence in lipid rafts of adenyllyl cyclase AC8 and its regulation by capacitative calcium entry". *Am J Physiol Cell Physiol* 296 (3): C607-619.
- Pahan, K. y Schmid, M. (2000).** "Activation of nuclear factor-kB in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis". *Neurosci Lett* 287 (1): 17-20.
- Palace, V.P.; Khaper, N.; Qin, Q. y Singal, P.K. (1999).** "Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease". *Free Radic Biol Med* 26 (5-6): 746-761.
- Palmer, H.J. y Paulson, K.E. (1997).** "Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression". *Nutr Rev* 55 (10): 353-361.
- Palmer, T.D.; Takahashi, J. y Gage, F.H. (1997).** "The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells". *Mol Cell Neurosci* 8 (6): 389-404.
- Pan, M.G.; Florio, T. y Stork, P.J. (1992).** "G protein activation of a hormone-stimulated phosphatase in human tumor cells". *Science* 256 (5060): 1215-1217.
- Pan, M.G.; Rim, C.; Lu, K.P.; Florio, T. y Stork, P.J. (1993).** "Cloning and expression of two structurally distinct receptor-linked protein-tyrosine phosphatases generated by RNA processing from a single gene". *J Biol Chem* 268 (26): 19284-19291.
- Papachristou, D.N.; Liu, J.L. y Patel, Y.C. (1994).** "Glucocorticoids regulate somatostatin peptide and steady state messenger ribonucleic acid levels in normal rat tissues and in a somatostatin-producing islet tumor cell line (1027B2)". *Endocrinology* 134 (5): 2259-2266.
- Pardo-Fernández, P.; Matus de la Parra, A. y San Juan Serrano, F. (2002).** "Búsqueda de marcadores de madurez de los gametos durante el ciclo gametogénico de *Crassostrea gigas*". *Bol Inst Esp Oceanogr* 18 (1-4): 165-173.
- Park, S.J.; Kim, H.Y.; Kim, H.; Park, S.M.; Joe, E.H.; Jou, I. y Choi, Y.H. (2009).** "Oxidative stress induces lipid-raft-mediated activation of Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 2 in astrocytes". *Free Radic Biol Med* 46 (12): 1694-1702.



- Patel, Y.C. y Reichlin, S. (1978). "Somatostatin in hypothalamus, extrahypothalamic brain, and peripheral tissues of the rat". *Endocrinology* 102 (2): 523-530.
- Patel, Y.C.; Murthy, K.K.; Escher, E.E.; Banville, D.; Spiess, J. y Srikant, C.B. (1990). "Mechanism of action of somatostatin: an overview of receptor function and studies of the molecular characterization and purification of somatostatin receptor proteins". *Metabolism* 39 (9 Suppl 2): 63-69.
- Patel, Y.C. (1992). "General aspects of the biology and function of somatostatin". *Weil C., Müller, E.E., Thorner, M.O. Basic and clinical aspects of neuroscience*. Berlin, Springer-Verlag. 4: 1-16.
- Patel, Y.C.; Greenwood, M.; Kent, G.; Panetta, R. y Srikant, C.B. (1993). "Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2: tissue selective distribution and cAMP regulation". *Biochem Biophys Res Commun* 192 (1): 288-294.
- Patel, Y.C. y Galanopoulou, A. (1995). "Processing and intracellular targeting of prosomatostatin-derived peptides: the role of mammalian endoproteases". *Ciba Found Symp* 190: 26-40; discussion 40-50.
- Patel, Y.C. (1999). "Somatostatin and its receptor family". *Front Neuroendocrinol* 20 (3): 157-198.
- Patel, R.C.; Kumar, U.; Lamb, D.C.; Eid, J.S.; Rocheville, M.; Grant, M.; Rani, A.; Hazlett, T.; Patel, S.C.; Gratton, E. y Patel, Y.C. (2002). "Ligand binding to somatostatin receptors induces receptor-specific oligomer formation in live cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (5): 3294-3299.
- Patterson, S.L.; Pittenger, C.; Morozov, A.; Martin, K.C.; Scanlin, H.; Drake, C. y Kandel, E.R. (2001). "Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase". *Neuron* 32 (1): 123-140.
- Pazak, H.E. y Scholz, R.W. (1996). "Effects of maternal vitamin E and selenium status during the perinatal period on age-related changes in tissue concentration of vitamin E in rat pups". *Int J Vitam Nutr Res* 66 (2): 126-133.
- Pelletier, G.; Leclerc, R.; Dube, D.; Labrie, F.; Puviani, R.; Arimura, A. y Schally, A.V. (1975). "Localization of growth hormone-release-inhibiting hormone (somatostatin) in the rat brain". *Am J Anat* 142 (3): 397-401.
- Penela, P.; Elorza, A.; Sarnago, S. y Mayor, F., Jr. (2001). "Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2". *Embo J* 20 (18): 5129-5138.
- Penela, P.; Ribas, C. y Mayor, F., Jr. (2003). "Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases". *Cell Signal* 15 (11): 973-981.
- Penn, R.B.; Pronin, A.N. y Benovic, J.L. (2000). "Regulation of G protein-coupled receptor kinases". *Trends Cardiovasc Med* 10 (2): 81-89.
- Peplowski, M.A.; Mahan, D.C.; Murray, F.A.; Moxon, A.L.; Cantor, A.H. y Ekstrom, K.E. (1980). "Effect of dietary and injectable vitamin E and selenium in weanling swine antigenically challenged with sheep red blood cells". *J Anim Sci* 51 (2): 344-351.
- Pérez, J.; Rigo, M.; Kaupmann, K.; Bruns, C.; Yasuda, K.; Bell, G.I.; Lubbert, H. y Hoyer, D. (1994). "Localization of somatostatin (SRIF) SSTR-1, SSTR-2 and SSTR-3 receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 349 (2): 145-160.
- Perkins, A.V. (2006). "Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia". *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 46 (2): 77-83.





- Perkins, E.; Warren, S.; Lin, R.C. y May, P.J. (2006).** "Projections of somatosensory cortex and frontal eye fields onto incertotectal neurons in the cat". *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288 (12): 1310-1329.
- Pfaffl, M.W. (2001).** "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR". *Nucleic Acids Res* 29 (9): e45.
- Pfeiffer, M.; Koch, T.; Schroder, H.; Klutzny, M.; Kirscht, S.; Kreienkamp, H.J.; Holtt, V. y Schulz, S. (2001).** "Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A)". *J Biol Chem* 276 (17): 14027-14036.
- Pfeiffer, M.; Koch, T.; Schroder, H.; Laugsch, M.; Holtt, V. y Schulz, S. (2002).** "Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization". *J Biol Chem* 277 (22): 19762-19772.
- Piedrafita, F.J. y Pfahl, M. (1997).** "Retinoid-induced apoptosis and Sp1 cleavage occur independently of transcription and require caspase activation". *Mol Cell Biol* 17 (11): 6348-6358.
- Pillai, S.R.; Traber, M.G.; Steiss, J.E.; Kayden, H.J. y Cox, N.R. (1993).** "Alpha-tocopherol concentrations of the nervous system and selected tissues of adult dogs fed three levels of vitamin E". *Lipids* 28 (12): 1101-1105.
- Pittman, Q.J. y Siggins, G.R. (1981).** "Somatostatin hyperpolarizes hippocampal pyramidal cells in vitro". *Brain Res* 221 (2): 402-408.
- Player, M.E.; Kim, H.J.; Lee, H.O. y Min, D.B. (2006).** "Stability of alpha-, beta-, or delta-tocopherol during soybean oil oxidation". *J Food Sci* 71: C456-C460.
- Pradayrol, L.; Jornvall, H.; Mutt, V. y Ribet, A. (1980).** "N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28". *FEBS Lett* 109 (1): 55-58.
- Priyanka, S. y Medhamurthy, R. (2007).** "Characterization of cAMP/PKA/CREB signaling cascade in the bonnet monkey corpus luteum: expressions of inhibin-alpha and StAR during different functional status". *Mol Hum Reprod* 13 (6): 381-390.
- Pronin, A.N. y Benovic, J.L. (1997).** "Regulation of the G protein-coupled receptor kinase GRK5 by protein kinase C". *J Biol Chem* 272 (6): 3806-3812.
- Puebla, L. y Arilla-Ferreiro, E. (2003).** "Modulation of somatostatin receptors, somatostatin content and Gi proteins by substance P in the rat frontoparietal cortex and hippocampus". *J Neurochem* 84 (1): 145-156.
- Pugh, E.N., Jr. y Lamb, T.D. (1990).** "Cyclic GMP and calcium: the internal messengers of excitation and adaptation in vertebrate photoreceptors". *Vision Res* 30 (12): 1923-1948.
- Purves, D.; Augustine, G.J.; Fitzpatrick, D. y Klajn, D.S. (2006).** *Neurociencia*, Editorial Panamericana.
- Putcha, G.V.; Deshmukh, M. y Johnson, E.M., Jr. (1999).** "BAX translocation is a critical event in neuronal apoptosis: regulation by neuroprotectants, BCL-2, and caspases". *J Neurosci* 19 (17): 7476-7485.
- Quinn, P.J. (2004).** "Is the distribution of alpha-tocopherol in membranes consistent with its putative functions?" *Biochemistry (Mosc)* 69 (1): 58-66.
- Rahman, A.S.; Kimura, M.; Yokoi, K.; Naher, T.E. y Itokawa, Y. (1996).** "Neurological disorder and excessive accumulation of calcium in brain of clinically vitamin A-deficient rats". *Biol Trace Elem Res* 53 (1-3): 57-64.



- Rajaraman, V.; Nonnecke, B.J. y Horst, R.L. (1997).** "Effects of replacement of native fat in colostrum and milk with coconut oil on fat-soluble vitamins in serum and immune function in calves". *J Dairy Sci* 80 (10): 2380-2390.
- Ramírez, J.L.; Mouchantaf, R.; Kumar, U.; Otero Corchón, V.; Rubinstein, M.; Low, M.J. y Patel, Y.C. (2002).** "Brain somatostatin receptors are up-regulated in somatostatin-deficient mice". *Mol Endocrinol* 16 (8): 1951-1963.
- Ramón y Cajal, S. (1911).** *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres*. Paris, Maloine.
- Raully, I.; Saint-Laurent, N.; Delesque, N.; Buscail, L.; Esteve, J.P.; Vaysse, N. y Susini, C. (1996).** "Induction of a negative autocrine loop by expression of sst2 somatostatin receptor in NIH 3T3 cells". *J Clin Invest* 97 (8): 1874-1883.
- Raynor, K.; O'Carroll, A.M.; Kong, H.; Yasuda, K.; Mahan, L.C.; Bell, G.I. y Reisine, T. (1993).** "Characterization of cloned somatostatin receptors SSTR4 and SSTR5". *Mol Pharmacol* 44 (2): 385-392.
- Reardon, D.B.; Dent, P.; Wood, S.L.; Kong, T. y Sturgill, T.W. (1997).** "Activation in vitro of somatostatin receptor subtypes 2, 3, or 4 stimulates protein tyrosine phosphatase activity in membranes from transfected Ras-transformed NIH 3T3 cells: coexpression with catalytically inactive SHP-2 blocks responsiveness". *Mol Endocrinol* 11 (8): 1062-1069.
- Reddanna, P.; Rao, M.K. y Reddy, C.C. (1985).** "Inhibition of 5-lipoxygenase by vitamin E". *FEBS Lett* 193 (1): 39-43.
- Reed, D.J. (1986).** "Defense mechanisms of normal and tumor cells". *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12 (8): 1457-1461.
- Reeve, A.K.; Krishnan, K.J. y Turnbull, D.M. (2008).** "Age related mitochondrial degenerative disorders in humans". *Biotechnol J* 3 (6): 750-756.
- Reichlin, S. (1983).** "Somatostatin". *N Engl J Med* 309 (24): 1495-1501.
- Reisine, T. y Guild, S. (1985).** "Pertussis toxin blocks somatostatin inhibition of calcium mobilization and reduces the affinity of somatostatin receptors for agonists". *J Pharmacol Exp Ther* 235 (3): 551-557.
- Reisine, T.; Zhang, Y.L. y Sekura, R. (1985).** "Pertussis toxin treatment blocks the inhibition of somatostatin and increases the stimulation by forskolin of cyclic AMP accumulation and adrenocorticotropin secretion from mouse anterior pituitary tumor cells". *J Pharmacol Exp Ther* 232 (1): 275-282.
- Reisine, T. (1995).** "Somatostatin receptors". *Am J Physiol* 269 (6 Pt 1): G813-820.
- Reisine, T. y Bell, G.I. (1995a).** "Molecular biology of somatostatin receptors". *Endocr Rev* 16 (4): 427-442.
- Reisine, T. y Bell, G.I. (1995b).** "Molecular properties of somatostatin receptors". *Neuroscience* 67 (4): 777-790.
- Rens-Domiano, S. y Reisine, T. (1992).** "Biochemical and functional properties of somatostatin receptors". *J Neurochem* 58 (6): 1987-1996.
- Reubi, J.C.; Perrin, M.H.; Rivier, J.E. y Vale, W. (1981).** "High affinity binding sites for a somatostatin-28 analog in rat brain". *Life Sci* 28 (19): 2191-2198.
- Reubi, J.C. (1984).** "Evidence for two somatostatin-14 receptor types in rat brain cortex". *Neurosci Lett* 49 (3): 259-263.
- Rhee, S.G. y Choi, K.D. (1992).** "Multiple forms of phospholipase C isozymes and their activation mechanisms". *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 26: 35-61.
- Ricciarelli, R.; Zingg, J.M. y Azzi, A. (2001).** "Vitamin E: protective role of a Janus molecule". *Faseb J* 15 (13): 2314-2325.



- Ricciarelli, R.; Zingg, J.M. y Azzi, A. (2002).** "The 80th anniversary of vitamin E: beyond its antioxidant properties". *Biol Chem* 383 (3-4): 457-465.
- Richard, S. y Zingg, H.H. (1991).** "Identification of a retinoic acid response element in the human oxytocin promoter". *J Biol Chem* 266 (32): 21428-21433.
- Richie, J.P., Jr.; Abraham, P. y Leutzinger, Y. (1996).** "Long-term stability of blood glutathione and cysteine in humans". *Clin Chem* 42 (7): 1100-1105.
- Robison, G.A.; Butcher, R.W. y Sutherland, E.W. (1968).** "Cyclic AMP". *Annu Rev Biochem* 37: 149-174.
- Rocheville, M.; Lange, D.C.; Kumar, U.; Patel, S.C.; Patel, R.C. y Patel, Y.C. (2000a).** "Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity". *Science* 288 (5463): 154-157.
- Rocheville, M.; Lange, D.C.; Kumar, U.; Sasi, R.; Patel, R.C. y Patel, Y.C. (2000b).** "Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers". *J Biol Chem* 275 (11): 7862-7869.
- Rodríguez, M.N.; Gómez-Pan, A. y Arilla, E. (1988).** "Decrease in number of somatostatin receptors in rat brain after adrenalectomy: normalization after glucocorticoid replacement". *Endocrinology* 123 (2): 1147-1152.
- Rohrer, L.; Raulf, F.; Bruns, C.; Buettner, R.; Hofstaedter, F. y Schule, R. (1993).** "Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor". *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (9): 4196-4200.
- Rosdahl, J.A.; Mourton, T.L. y Brady-Kalnay, S.M. (2002).** "Protein kinase C delta (PKCdelta) is required for protein tyrosine phosphatase mu (PTPmu)-dependent neurite outgrowth". *Mol Cell Neurosci* 19 (2): 292-306.
- Rosenfeld, L. (1997).** "Vitamine--vitamin. The early years of discovery". *Clin Chem* 43 (4): 680-685.
- Rosenthal, D.; Lancillotti, F.; Darwiche, N.; Sinha, R. y de Luca, L. (1994).** "Regulation of epithelia differentiation by retinoids". *Vitamin A in Health and Disease*. R. Blomhoff. New York, Marcel Dekker Inc: 425-450.
- Ross, A.C. (1982).** "Retinol esterification by mammary gland microsomes from the lactating rat". *J Lipid Res* 23 (1): 133-144.
- Ross, E.M. (1989).** "Signal sorting and amplification through G protein-coupled receptors". *Neuron* 3 (2): 141-152.
- Ross, A.C. y Gardner, E.M. (1994).** "The function of vitamin A in cellular growth and differentiation, and its roles during pregnancy and lactation". *Adv Exp Med Biol* 352: 187-200.
- Ross, S.A.; McCaffery, P.J.; Drager, U.C. y De Luca, L.M. (2000).** "Retinoids in embryonal development". *Physiol Rev* 80 (3): 1021-1054.
- Rota, C.; Barella, L.; Minihane, A.M.; Stocklin, E. y Rimbach, G. (2004).** "Dietary alpha-tocopherol affects differential gene expression in rat testes". *IUBMB Life* 56 (5): 277-280.
- Roth, A.; Kreienkamp, H.J.; Nehring, R.B.; Roosterman, D.; Meyerhof, W. y Richter, D. (1997).** "Endocytosis of the rat somatostatin receptors: subtype discrimination, ligand specificity, and delineation of carboxy-terminal positive and negative sequence motifs". *DNA Cell Biol* 16 (1): 111-119.



- Royer, M.C.; Lemaire-Ewing, S.; Desrumaux, C.; Monier, S.; Pais de Barros, J.P.; Athias, A.; Neel, D. y Lagrost, L. (2009). "7-Ketocholesterol Incorporation into Sphingolipid/Cholesterol-enriched (Lipid Raft) Domains Is Impaired by Vitamin E: A specific role for  $\alpha$ -Tocopherol with consequences on cell death". *J Biol Chem* 284 (23): 15826-15834.
- Rubbo, H.; Radi, R.; Anselmi, D.; Kirk, M.; Barnes, S.; Butler, J.; Eiserich, J.P. y Freeman, B.A. (2000). "Nitric oxide reaction with lipid peroxy radicals spares  $\alpha$ -tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/ $\alpha$ -tocopherol than  $\alpha$ -tocopherol/ascorbate". *J Biol Chem* 275 (15): 10812-10818.
- Rubinow, D.R.; Post, R.M.; Davis, C.L. y Doran, A.R. (1987). "Somatostatin and GHRH: mood and behavioral regulation". *Adv Biochem Psychopharmacol* 43: 137-152.
- Rush, A.M.; Wu, J.; Rowan, M.J. y Anwyl, R. (2002). "Group I metabotropic glutamate receptor (mGluR)-dependent long-term depression mediated via p38 mitogen-activated protein kinase is inhibited by previous high-frequency stimulation and activation of mGluRs and protein kinase C in the rat dentate gyrus in vitro". *J Neurosci* 22 (14): 6121-6128.
- Ryan, T.P. y Aust, S.D. (1992). "The role of iron in oxygen-mediated toxicities". *Crit Rev Toxicol* 22 (2): 119-141.
- Sabat, R.; Guthmann, F. y Rustow, B. (2008). "Formation of reactive oxygen species in lung alveolar cells: effect of vitamin E deficiency". *Lung* 186 (2): 115-122.
- Saini, H.S.; Gorse, K.M.; Boxer, L.M. y Sato-Bigbee, C. (2004). "Neurotrophin-3 and a CREB-mediated signaling pathway regulate Bcl-2 expression in oligodendrocyte progenitor cells". *J Neurochem* 89 (4): 951-961.
- Salazar, J.; Mena, N. y Nunez, M.T. (2006). "Iron dyshomeostasis in Parkinson's disease". *J Neural Transm Suppl* (71): 205-213.
- Salbert, G.; Fanjul, A.; Piedrafita, F.J.; Lu, X.P.; Kim, S.J.; Tran, P. y Pfahl, M. (1993). "Retinoic acid receptors and retinoid X receptor- $\alpha$  down-regulate the transforming growth factor- $\beta$  1 promoter by antagonizing AP-1 activity". *Mol Endocrinol* 7 (10): 1347-1356.
- Salcedo, A.; Mayor, F., Jr. y Penela, P. (2006). "Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2". *Embo J* 25 (20): 4752-4762.
- Sallese, M.; Iacovelli, L.; Cumashi, A.; Capobianco, L.; Cuomo, L. y De Blasi, A. (2000). "Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins". *Biochim Biophys Acta* 1498 (2-3): 112-121.
- Salmeen, A.; Andersen, J.N.; Myers, M.P.; Meng, T.C.; Hinks, J.A.; Tonks, N.K. y Barford, D. (2003). "Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate". *Nature* 423 (6941): 769-773.
- Samad, T.A.; Krezel, W.; Chambon, P. y Borrelli, E. (1997). "Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor-retinoid X receptor family". *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (26): 14349-14354.
- Sayre, L.M.; Perry, G. y Smith, M.A. (1999). "Redox metals and neurodegenerative disease". *Curr Opin Chem Biol* 3 (2): 220-225.
- Sayre, L.M.; Lin, D.; Yuan, Q.; Zhu, X. y Tang, X. (2006). "Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one". *Drug Metab Rev* 38 (4): 651-675.



- Sayre, L.M.; Perry, G. y Smith, M.A. (2008). "Oxidative stress and neurotoxicity". *Chem Res Toxicol* 21 (1): 172-188.
- Scatchard, G. (1949). "The attractions of proteins for small molecules and ions". *Annals of the New York Academy of Sciences* 51: 660-672.
- Scharfman, H.E. y Schwartzkroin, P.A. (1988). "Electrophysiology of morphologically identified mossy cells of the dentate hilus recorded in guinea pig hippocampal slices". *J Neurosci* 8 (10): 3812-3821.
- Schaur, R.J. (2003). "Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal". *Mol Aspects Med* 24 (4-5): 149-159.
- Schettini, G.; Florio, T.; Meucci, O.; Landolfi, E.; Grimaldi, M.; Ventra, C. y Marino, A. (1989). "Somatostatin inhibition of adenylate cyclase activity in different brain areas". *Brain Res* 492 (1-2): 65-71.
- Schindler, M.; Sellers, L.A.; Humphrey, P.P. y Emson, P.C. (1997). "Immunohistochemical localization of the somatostatin SST2(A) receptor in the rat brain and spinal cord". *Neuroscience* 76 (1): 225-240.
- Schmidt, K. y Nikoleit, D.A. (1991). "Natiirliches und synthetisches Vitamin E: Wo liegt der Unterschied?" *Vitamine, Mineralstoffe, Spurenelemente* 6: 98-111.
- Schonbrunn, A. y Tashjian, H., Jr. (1978). "Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture". *J Biol Chem* 253 (18): 6473-6483.
- Schüep, W. y Rettenmainer, R. (1984). "Analysis of Vitamin E homologs in plasma and tissue: High-Performance Liquid Chromatography". *Method Enzimol* 234: 294-302.
- Schwartz, J.P.; Ji, Z. y Epelbaum, J. (1998). "Somatostatin as a neurotrophic factor. Which receptor/second messenger transduction system is involved?" *Perspect Dev Neurobiol* 5 (4): 427-435.
- Schweigert, F.J. (1990). "Effect of gestation and lactation on lipoprotein pattern and composition in dairy cows". *J Anim Physiol Anim Nutr* 63: 75-83.
- Schweigert, F.J.; Ryder, O.A.; Rambeck, W.A. y Zucker, H. (1990). "The majority of vitamin A is transported as retinyl esters in the blood of most carnivores". *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 95 (4): 573-578.
- Schweitzer, P.; Madamba, S. y Siggins, G.R. (1990). "Arachidonic acid metabolites as mediators of somatostatin-induced increase of neuronal M-current". *Nature* 346 (6283): 464-467.
- Schwindinger, W.F. y Robishaw, J.D. (2001). "Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation". *Oncogene* 20 (13): 1653-1660.
- Seamon, K. y Daly, J.W. (1981). "Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein". *J Biol Chem* 256 (19): 9799-9801.
- Seki, T. y Rutishauser, U. (1998). "Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus". *J Neurosci* 18 (10): 3757-3766.
- Semba, R.D. (1998). "The role of vitamin A and related retinoids in immune function". *Nutr Rev* 56 (1 Pt 2): S38-48.
- Sen, C.K.; Khanna, S.; Rink, C. y Roy, S. (2007). "Tocotrienols: the emerging face of natural vitamin E". *Vitam Horm* 76: 203-261.
- Shaik, I.H. y Mehvar, R. (2006). "Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: application to the rat liver and bile samples". *Anal Bioanal Chem* 385 (1): 105-113.





- Shapiro, M. (2001).** "Plasticity, hippocampal place cells, and cognitive maps". *Arch Neurol* 58 (6): 874-881.
- Sharma, K.; Patel, Y.C. y Srikant, C.B. (1996).** "Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3". *Mol Endocrinol* 10 (12): 1688-1696.
- Shen, X.; Li, Q.L.; Brent, G.A. y Friedman, T.C. (2005).** "Regulation of regional expression in rat brain PC2 by thyroid hormone/characterization of novel negative thyroid hormone response elements in the PC2 promoter". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288 (1): E236-245.
- Shimizu, T.; Mori, M.; Bito, H.; Sakanaka, C.; Tabuchi, S.; Aihara, M. y Kume, K. (1996).** "Platelet-activating factor and somatostatin activate mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) and arachidonate release". *J Lipid Mediat Cell Signal* 14 (1-3): 103-108.
- Siehler, S. y Hoyer, D. (1999).** "Characterisation of human recombinant somatostatin receptors. 4. Modulation of phospholipase C activity". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360 (5): 522-532.
- Sies, H. (1993).** "Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection". *Mutat Res* 299 (3-4): 183-191.
- Simon, E.J.; Gross, C.S. y Milhorat, A.T. (1956a).** "The metabolism of vitamin E. I. The absorption and excretion of d-alpha-tocopheryl-5-methyl-C14-succinate". *J Biol Chem* 221 (2): 797-805.
- Simon, E.J.; Eisengart, A.; Sundheim, L. y Milhorat, A.T. (1956b).** "The metabolism of vitamin E. II. Purification and characterization of urinary metabolites of alpha-tocopherol". *J Biol Chem* 221 (2): 807-817.
- Simon, M.I.; Strathmann, M.P. y Gautam, N. (1991).** "Diversity of G proteins in signal transduction". *Science* 252 (5007): 802-808.
- Sinha, R.; Block, G. y Taylor, P.R. (1992).** "Determinants of plasma ascorbic acid in a healthy male population". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1 (4): 297-302.
- Sinha, S. y Chiswick, M. (1992).** "Vitamin E in the newborn". *Vitamin E in health and disease*. L. Packer y J. Fuschs. New York, Marcel Dekker: 861-872.
- Sivaprasadarao, A. y Findlay, J.B. (1994).** "Structure-function studies on human retinol-binding protein using site-directed mutagenesis". *Biochem J* 300 ( Pt 2): 437-442.
- Sklan, D. y Donoghue, S. (1982).** "Vitamin E response to high dietary vitamin A in the chick". *J Nutr* 112 (4): 759-765.
- Smalley, K.S.; Feniuk, W. y Humphrey, P.P. (1998).** "Differential agonist activity of somatostatin and L-362855 at human recombinant sst4 receptors". *Br J Pharmacol* 125 (4): 833-841.
- Snyder, E.M.; Philpot, B.D.; Huber, K.M.; Dong, X.; Fallon, J.R. y Bear, M.F. (2001).** "Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation". *Nat Neurosci* 4 (11): 1079-1085.
- Socci, D.J.; Crandall, B.M. y Arendash, G.W. (1995).** "Chronic antioxidant treatment improves the cognitive performance of aged rats". *Brain Res* 693 (1-2): 88-94.
- Sodum, R.S. y Chung, F.L. (1988).** "1,N2-ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by trans-4-hydroxy-2-nonenal". *Cancer Res* 48 (2): 320-323.
- Sokol, R.J. (1988).** "Vitamin E deficiency and neurologic disease". *Annu Rev Nutr* 8: 351-373.
- Soprano, D.R.; Qin, P. y Soprano, K.J. (2004).** "Retinoic acid receptors and cancers". *Annu Rev Nutr* 24: 201-221.



- Sprang, S.R.; Chen, Z. y Du, X. (2007).** "Structural basis of effector regulation and signal termination in heterotrimeric Galpha proteins". *Adv Protein Chem* 74: 1-65.
- Squire, L.R. y Kandel, E.R. (1999).** *Memory: From Mind to Molecules*. New York, W.H. Freeman & Co.
- Srikant, C.B. y Patel, Y.C. (1981).** "Somatostatin analogs. Dissociation of brain receptor binding affinities and pituitary actions in the rat". *Endocrinology* 108 (1): 341-343.
- Srikant, C.B. y Patel, Y.C. (1984).** "Cysteamine-induced depletion of brain somatostatin is associated with up-regulation of cerebrocortical somatostatin receptors". *Endocrinology* 115 (3): 990-995.
- Stadtman, E.R. y Levine, R.L. (2003).** "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins". *Amino Acids* 25 (3-4): 207-218.
- Stahl, W. y Sies, H. (1994).** "Separation of geometrical isomers of beta-carotene and lycopene". *Methods Enzymol* 234: 388-400.
- Stahl, W.; van den Berg, H.; Arthur, J.; Bast, A.; Dainty, J.; Faulks, R.M.; Gartner, C.; Haenen, G.; Hollman, P.; Holst, B.; Kelly, F.J.; Polidori, M.C.; Rice-Evans, C.; Southon, S.; van Vliet, T.; Vina-Ribes, J.; Williamson, G. y Astley, S.B. (2002).** "Bioavailability and metabolism". *Mol Aspects Med* 23 (1-3): 39-100.
- Stancampiano, R.; Carta, M. y Fadda, F. (2007).** "Vitamin A deficiency affects neither frontocortical acetylcholine nor working memory". *Neuroreport* 18 (3): 241-243.
- Stephensen, C.B. (2001).** "Vitamin A, infection, and immune function". *Annu Rev Nutr* 21: 167-192.
- Steták, A.; Lanckenau, A.; Vantus, T.; Csermely, P.; Ullrich, A. y Keri, G. (2001).** "The antitumor somatostatin analogue TT-232 induces cell cycle arrest through PKCdelta and c-Src". *Biochem Biophys Res Commun* 285 (2): 483-488.
- Stoilov, I. (2001).** "Cytochrome P450s: coupling development and environment". *Trends Genet* 17 (11): 629-632.
- Stowe, H.D. (1982).** "Vitamin A profiles of equine serum and milk". *J Anim Sci* 54 (1): 76-81.
- Strader, C.D.; Fong, T.M.; Graziano, M.P. y Tota, M.R. (1995).** "The family of G-protein-coupled receptors". *Faseb J* 9 (9): 745-754.
- Strowski, M.Z.; Parmar, R.M.; Blake, A.D. y Schaeffer, J.M. (2000).** "Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice". *Endocrinology* 141 (1): 111-117.
- Stumm, R.K.; Zhou, C.; Schulz, S.; Endres, M.; Kronenberg, G.; Allen, J.P.; Tulipano, G. y Hollt, V. (2004).** "Somatostatin receptor 2 is activated in cortical neurons and contributes to neurodegeneration after focal ischemia". *J Neurosci* 24 (50): 11404-11415.
- Sunahara, R.K.; Dessauer, C.W.; Whisnant, R.E.; Kleuss, C. y Gilman, A.G. (1997).** "Interaction of Galpha with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase". *J Biol Chem* 272 (35): 22265-22271.
- Sunahara, R.K. y Taussig, R. (2002).** "Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling". *Mol Interv* 2 (3): 168-184.
- Suzuki, U. (1911).** *Tokyo Kagaku Kaishi* 32 (1): 4-17.
- Suzuki, Y.J.; Tsuchiya, M.; Wassall, S.R.; Choo, Y.M.; Govil, G.; Kagan, V.E. y Packer, L. (1993).** "Structural and dynamic membrane properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency". *Biochemistry* 32 (40): 10692-10699.





- Sylvester, P.W.; McIntyre, B.S.; Gapor, A. y Briski, K.P. (2001). "Vitamin E inhibition of normal mammary epithelial cell growth is associated with a reduction in protein kinase C(alpha) activation". *Cell Prolif* 34 (6): 347-357.
- Takahashi, J.; Palmer, T.D. y Gage, F.H. (1999). "Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures". *J Neurobiol* 38 (1): 65-81.
- Tallent, M.; Liapakis, G.; O'Carroll, A.M.; Lolait, S.J.; Dichter, M. y Reisine, T. (1996). "Somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 couple negatively to an L-type  $Ca^{2+}$  current in the pituitary cell line AtT-20". *Neuroscience* 71 (4): 1073-1081.
- Tallent, M.K. y Siggins, G.R. (1999). "Somatostatin acts in CA1 and CA3 to reduce hippocampal epileptiform activity". *J Neurophysiol* 81 (4): 1626-1635.
- Tang, W.J. y Gilman, A.G. (1991). "Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits". *Science* 254 (5037): 1500-1503.
- Tappel, A.L. (1962). "Vitamin E as the biological lipid antioxidant ". *Vitam Hormon* 20: 493-510
- Taussig, R.; Iniguez-Lluhi, J.A. y Gilman, A.G. (1993). "Inhibition of adenylyl cyclase by  $G_i$  alpha". *Science* 261 (5118): 218-221.
- Tentler, J.J.; Hadcock, J.R. y Gutierrez-Hartmann, A. (1997). "Somatostatin acts by inhibiting the cyclic 3',5'-adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A pathway, cAMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation, and CREB transcription potency". *Mol Endocrinol* 11 (7): 859-866.
- Teruel, M.N. y Meyer, T. (2000). "Translocation and reversible localization of signaling proteins: a dynamic future for signal transduction". *Cell* 103 (2): 181-184.
- Thangaraju, M.; Sharma, K.; Liu, D.; Shen, S.H. y Srikant, C.B. (1999a). "Interdependent regulation of intracellular acidification and SHP-1 in apoptosis". *Cancer Res* 59 (7): 1649-1654.
- Thangaraju, M.; Sharma, K.; Leber, B.; Andrews, D.W.; Shen, S.H. y Srikant, C.B. (1999b). "Regulation of acidification and apoptosis by SHP-1 and Bcl-2". *J Biol Chem* 274 (41): 29549-29557.
- Theodoropoulou, M.; Zhang, J.; Laupheimer, S.; Paez-Pereda, M.; Erneux, C.; Florio, T.; Pagotto, U. y Stalla, G.K. (2006). "Octreotide, a somatostatin analogue, mediates its antiproliferative action in pituitary tumor cells by altering phosphatidylinositol 3-kinase signaling and inducing *Zac1* expression". *Cancer Res* 66 (3): 1576-1582.
- Thompson, J.N. y Pitt, G.A. (1963). "The Conversion of Retinyl Methyl Ether (Vitamin A Methyl Ether) to Retinol (Vitamin A Alcohol) in Vivo". *Biochim Biophys Acta* 78: 753-755.
- Thompson, J.N.; Howell, J.M. y Pitt, G.A. (1964). "Vitamin A and Reproduction in Rats". *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 159: 510-535.
- Tolón, R.; Franco, F.S.; Villuendas, G.; Vicente, A.B.; Palacios, N. y Cacicedo, L. (2000). "Potassium depolarization-induced cAMP stimulates somatostatin mRNA levels in cultured diencephalic neurons". *Brain Res* 868 (2): 338-346.
- Tomura, H.; Okajima, F.; Akbar, M.; Abdul Majid, M.; Sho, K. y Kondo, Y. (1994). "Transfected human somatostatin receptor type 2, SSTR2, not only inhibits adenylate cyclase but also stimulates phospholipase C and  $Ca^{2+}$  mobilization". *Biochem Biophys Res Commun* 200 (2): 986-992.
- Tonks, N.K. y Neel, B.G. (2001). "Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases". *Curr Opin Cell Biol* 13 (2): 182-195.



- Tonks, N.K. (2005).** "Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling". *Cell* 121 (5): 667-670.
- Tonks, N.K. (2006).** "Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease". *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (11): 833-846.
- Traber, M.G. y Kayden, H.J. (1984).** "Vitamin E is delivered to cells via the high affinity receptor for low-density lipoprotein". *Am J Clin Nutr* 40 (4): 747-751.
- Traber, M.G.; Olivecrona, T. y Kayden, H.J. (1985).** "Bovine milk lipoprotein lipase transfers tocopherol to human fibroblasts during triglyceride hydrolysis in vitro". *J Clin Invest* 75 (5): 1729-1734.
- Traber, M.G.; Lane, J.C.; Lagmay, N.R. y Kayden, H.J. (1992).** "Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins". *Lipids* 27 (9): 657-663.
- Traber, M.G. y Arai, H. (1999).** "Molecular mechanisms of vitamin E transport". *Annu Rev Nutr* 19: 343-355.
- Tracy, S.; van der Geer, P. y Hunter, T. (1995).** "The receptor-like protein-tyrosine phosphatase, RPTP alpha, is phosphorylated by protein kinase C on two serines close to the inner face of the plasma membrane". *J Biol Chem* 270 (18): 10587-10594.
- Tran, P.; Zhang, X.K.; Salbert, G.; Hermann, T.; Lehmann, J.M. y Pfahl, M. (1992).** "COUP orphan receptors are negative regulators of retinoic acid response pathways". *Mol Cell Biol* 12 (10): 4666-4676.
- Tsien, R.W.; Bean, B.P.; Hess, P.; Lansman, J.B.; Nilius, B. y Nowycky, M.C. (1986).** "Mechanisms of calcium channel modulation by beta-adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists". *J Mol Cell Cardiol* 18 (7): 691-710.
- Tsien, J.Z.; Huerta, P.T. y Tonegawa, S. (1996).** "The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory". *Cell* 87 (7): 1327-1338.
- Tsuji, M.; Inanami, O. y Kuwabara, M. (2000).** "Neuroprotective effect of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron in gerbil hippocampus is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway and heat shock proteins". *Neurosci Lett* 282 (1-2): 41-44.
- Tulipano, G. y Schulz, S. (2007).** "Novel insights in somatostatin receptor physiology". *Eur J Endocrinol* 156 Suppl 1: S3-11.
- Tulving, E. y Markowitsch, H.J. (1998).** "Episodic and declarative memory: role of the hippocampus". *Hippocampus* 8 (3): 198-204.
- Uesugi, Y.; Fuse, I.; Toba, K.; Kishi, K.; Hashimoto, S.; Furukawa, T.; Narita, M.; Takahashi, M. y Aizawa, Y. (2000).** "Inhibition of ATRA-induced myeloid differentiation in acute promyelocytic leukemia by a new protein tyrosine phosphatase inhibitor, 3,4-dephostatin". *J Exp Clin Cancer Res* 19 (3): 363-366.
- Ullrey, D.E. (1981).** "Vitamin E for swine". *J Anim Sci* 53 (4): 1039-1056.
- Valencia, A.M.; Oliva, J.L.; Bodega, G.; Chiloeches, A.; López-Ruiz, P.; Prieto, J.C.; Susini, C. y Colás, B. (1997).** "Identification of a protein-tyrosine phosphatase (SHP1) different from that associated with acid phosphatase in rat prostate". *FEBS Lett* 406 (1-2): 42-48.
- van Calker, D.; Müller, M. y Hamprecht, B. (1980).** "Regulation by secretin, vasoactive intestinal peptide, and somatostatin of cyclic AMP accumulation in cultured brain cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (11): 6907-6911.
- van der Zee, E.A.; Benoit, R.; Strosberg, A.D. y Luiten, P.G. (1991).** "Coexistence of muscarinic acetylcholine receptors and somatostatin in nonpyramidal neurons of the rat dorsal hippocampus". *Brain Res Bull* 26 (3): 343-351.



- Vaudry, H.; Chartrel, N. y Conlon, J.M. (1992). "Isolation of [Pro2, Met13]somatostatin-14 and somatostatin-14 from the frog brain reveals the existence of a somatostatin gene family in a tetrapod". *Biochem Biophys Res Commun* 188 (1): 477-482.
- Vecsei, L.; Kiraly, C.; Bollok, I.; Nagy, A.; Varga, J.; Penke, B. y Telegdy, G. (1984). "Comparative studies with somatostatin and cysteamine in different behavioral tests on rats". *Pharmacol Biochem Behav* 21 (6): 833-837.
- Vidal, C.; Raully, I.; Zeggari, M.; Delesque, N.; Esteve, J.P.; Saint-Laurent, N.; Vaysse, N. y Susini, C. (1994). "Up-regulation of somatostatin receptors by epidermal growth factor and gastrin in pancreatic cancer cells". *Mol Pharmacol* 46 (1): 97-104.
- Vila, M.; Ramonet, D. y Perier, C. (2008). "Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues". *J Neurochem* 107 (2): 317-328.
- Wagner, E.; Luo, T. y Drager, U.C. (2002). "Retinoic acid synthesis in the postnatal mouse brain marks distinct developmental stages and functional systems". *Cereb Cortex* 12 (12): 1244-1253.
- Wall, M.A.; Posner, B.A. y Sprang, S.R. (1998). "Structural basis of activity and subunit recognition in G protein heterotrimers". *Structure* 6 (9): 1169-1183.
- Wang, H.L.; Dichter, M. y Reisine, T. (1990). "Lack of cross-desensitization of somatostatin-14 and somatostatin-28 receptors coupled to potassium channels in rat neocortical neurons". *Mol Pharmacol* 38 (3): 357-361.
- Wang, X. y Quinn, P.J. (2000). "The location and function of vitamin E in membranes (review)". *Mol Membr Biol* 17 (3): 143-156.
- Wang, Y.T. y Linden, D.J. (2000). "Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis". *Neuron* 25 (3): 635-647.
- Weckbecker, G.; Lewis, I.; Albert, R.; Schmid, H.A.; Hoyer, D. y Bruns, C. (2003). "Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects". *Nat Rev Drug Discov* 2 (12): 999-1017.
- Weiss, R.E.; Reddi, A.H. y Nimni, M.E. (1981). "Somatostatin can locally inhibit proliferation and differentiation of cartilage and bone precursor cells". *Calcif Tissue Int* 33 (4): 425-430.
- Wellik, D.M.; Norback, D.H. y DeLuca, H.F. (1997). "Retinol is specifically required during midgestation for neonatal survival". *Am J Physiol* 272 (1 Pt 1): E25-29.
- Winsky-Sommerer, R.; Grouselle, D.; Rougeot, C.; Laurent, V.; David, J.P.; Delacourte, A.; Dournaud, P.; Seidah, N.G.; Lindberg, I.; Trottier, S. y Epelbaum, J. (2003). "The proprotein convertase PC2 is involved in the maturation of prosomatostatin to somatostatin-14 but not in the somatostatin deficit in Alzheimer's disease". *Neuroscience* 122 (2): 437-447.
- Winstel, R.; Freund, S.; Krasel, C.; Hoppe, E. y Lohse, M.J. (1996). "Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C". *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (5): 2105-2109.
- Wolf, G. (2001). "The discovery of the visual function of vitamin A". *J Nutr* 131 (6): 1647-1650.
- Wolf, G. (2005). "The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill". *J Nutr* 135 (3): 363-366.
- Wolowich, W.R.; Perkins, A.M. y Cienki, J.J. (2006). "Analysis of the psychoactive terpenoid salvinatorin A content in five *Salvia divinorum* herbal products". *Pharmacotherapy* 26 (9): 1268-1272.



- Xia, Z.; Dickens, M.; Raingeaud, J.; Davis, R.J. y Greenberg, M.E. (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis". *Science* 270 (5240): 1326-1331.
- Xiao, M.Y.; Zhou, Q. y Nicoll, R.A. (2001). "Metabotropic glutamate receptor activation causes a rapid redistribution of AMPA receptors". *Neuropharmacology* 41 (6): 664-671.
- Xie, Z. y Sastry, B.R. (1993). "Induction of hippocampal long-term potentiation by alpha-tocopherol". *Brain Res* 604 (1-2): 173-179.
- Xie, Z. y Sastry, B.R. (1995). "Impairment of long-term potentiation in rats fed with vitamin E-deficient diet". *Brain Res* 681 (1-2): 193-196.
- Xu, Y.; Bruno, J.F. y Berelowitz, M. (1995a). "Characterization of the proximal promoter region of the rat somatostatin receptor gene, SSTR4". *Biochem Biophys Res Commun* 206 (3): 935-941.
- Xu, Y.; Berelowitz, M. y Bruno, J.F. (1995b). "Dexamethasone regulates somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in rat pituitary GH4C1 cells". *Endocrinology* 136 (11): 5070-5075.
- Yajima, Y.; Akita, Y. y Saito, T. (1986). "Pertussis toxin blocks the inhibitory effects of somatostatin on cAMP-dependent vasoactive intestinal peptide and cAMP-independent thyrotropin releasing hormone-stimulated prolactin secretion of GH3 cells". *J Biol Chem* 261 (6): 2684-2689.
- Yamada, Y.; Post, S.R.; Wang, K.; Tager, H.S.; Bell, G.I. y Seino, S. (1992). "Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney". *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1): 251-255.
- Yamada, Y.; Reisine, T.; Law, S.F.; Ihara, Y.; Kubota, A.; Kagimoto, S.; Seino, M.; Seino, Y.; Bell, G.I. y Seino, S. (1992). "Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase". *Mol Endocrinol* 6 (12): 2136-2142.
- Yamada, Y.; Stoffel, M.; Espinosa, R., 3rd; Xiang, K.S.; Seino, M.; Seino, S.; Le Beau, M.M. y Bell, G.I. (1993). "Human somatostatin receptor genes: localization to human chromosomes 14, 17, and 22 and identification of simple tandem repeat polymorphisms". *Genomics* 15 (2): 449-452.
- Yamamoto, K.K.; Gonzalez, G.A.; Biggs, W.H., 3rd y Montminy, M.R. (1988). "Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB". *Nature* 334 (6182): 494-498.
- Yamamoto, Y.; Fujisawa, A.; Hara, A. y Dunlap, W.C. (2001). "An unusual vitamin E constituent (alpha-tocomenol) provides enhanced antioxidant protection in marine organisms adapted to cold-water environments". *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (23): 13144-13148.
- Yang, G.; Chan, P.H.; Chen, J.; Carlson, E.; Chen, S.F.; Weinstein, P.; Epstein, C.J. y Kamii, H. (1994). "Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia". *Stroke* 25 (1): 165-170.
- Yáñez, J.; Rodríguez-Moldes, I. y Anadón, R. (1992). "Distribution of somatostatin-immunoreactivity in the brain of the larval lamprey (*Petromyzon marinus*)". *J Chem Neuroanat* 5 (6): 511-520.



- Yasuda, K.; Rens-Domiano, S.; Breder, C.D.; Law, S.F.; Saper, C.B.; Reisine, T. y Bell, G.I. (1992).** "Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylyl cyclase". *J Biol Chem* 267 (28): 20422-20428.
- Yatani, A.; Birnbaumer, L. y Brown, A.M. (1990).** "Direct coupling of the somatostatin receptor to potassium channels by a G protein". *Metabolism* 39 (9 Suppl 2): 91-95.
- Yeager, R.E.; Heideman, W.; Rosenberg, G.B. y Storm, D.R. (1985).** "Purification of the calmodulin-sensitive adenylyl cyclase from bovine cerebral cortex". *Biochemistry* 24 (14): 3776-3783.
- Yew, D.T. y Chan, W.Y. (1999).** "Early appearance of acetylcholinergic, serotonergic, and peptidergic neurons and fibers in the developing human central nervous system". *Microsc Res Tech* 45 (6): 389-400.
- Young, V.R. y Newberne, P.M. (1981).** "Vitamins and cancer prevention: issues and dilemmas". *Cancer* 47 (5 Suppl): 1226-1240.
- Young, P.; Kirkham, D.M.; Murphy, G.J. y Cawthorne, M.A. (1991).** "Evaluation of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein Gi function in hepatocyte and liver membranes from obese Zucker (fa/fa) rats and their lean (Fa/?) littermates". *Diabetologia* 34 (8): 565-569.
- Yuyama, K.; Sekino-Suzuki, N.; Sanai, Y. y Kasahara, K. (2007).** "Translocation of activated heterotrimeric G protein G $\alpha$ (o) to ganglioside-enriched detergent-resistant membrane rafts in developing cerebellum". *J Biol Chem* 282 (36): 26392-26400.
- Zachman, R.D.; Kakkad, B. y Chytil, F. (1984).** "Perinatal rat lung retinol (vitamin A) and retinyl palmitate". *Pediatr Res* 18 (12): 1297-1299.
- Zachman, R.D. (1995).** "Role of vitamin A in lung development". *J Nutr* 125 (6 Suppl): 1634S-1638S.
- Zapata, P.D.; Roper, R.M.; Valencia, A.M.; Buscail, L.; Lopez, J.I.; Martin-Orozco, R.M.; Prieto, J.C.; Angulo, J.; Susini, C.; Lopez-Ruiz, P. y Colas, B. (2002).** "Autocrine regulation of human prostate carcinoma cell proliferation by somatostatin through the modulation of the SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1". *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2): 915-926.
- Zeggari, M.; Esteve, J.P.; Raully, I.; Cambillau, C.; Mazarguil, H.; Dufresne, M.; Pradayrol, L.; Chayvialle, J.A.; Vaysse, N. y Susini, C. (1994).** "Co-purification of a protein tyrosine phosphatase with activated somatostatin receptors from rat pancreatic acinar membranes". *Biochem J* 303 ( Pt 2): 441-448.
- Zetterström, R.H.; Simon, A.; Giacobini, M.M.; Eriksson, U. y Olson, L. (1994).** "Localization of cellular retinoid-binding proteins suggests specific roles for retinoids in the adult central nervous system". *Neuroscience* 62 (3): 899-918.
- Zetterström, R.H.; Lindqvist, E.; Mata de Urquiza, A.; Tomac, A.; Eriksson, U.; Perlmann, T. y Olson, L. (1999).** "Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid". *Eur J Neurosci* 11 (2): 407-416.
- Zhang, H.; Miller, R.H. y Rutishauser, U. (1992).** "Polysialic acid is required for optimal growth of axons on a neuronal substrate". *J Neurosci* 12 (8): 3107-3114.
- Zhang, J.R.; Andrus, P.K. y Hall, E.D. (1993).** "Age-related regional changes in hydroxyl radical stress and antioxidants in gerbil brain". *J Neurochem* 61 (5): 1640-1647.
- Zhang, Z.J.; Lappi, D.A.; Wrenn, C.C.; Milner, T.A. y Wiley, R.G. (1998).** "Selective lesion of the cholinergic basal forebrain causes a loss of cortical neuropeptide Y and somatostatin neurons". *Brain Res* 800 (2): 198-206.





- Zhang, L. y Jope, R.S. (1999).** "Oxidative stress differentially modulates phosphorylation of ERK, p38 and CREB induced by NGF or EGF in PC12 cells". *Neurobiol Aging* 20 (3): 271-278.
- Zhang, Q.Y.; Dunbar, D. y Kaminsky, L. (2000).** "Human cytochrome P-450 metabolism of retinals to retinoic acids". *Drug Metab Dispos* 28 (3): 292-297.
- Zhang, Y.; Dawson, V.L. y Dawson, T.M. (2000).** "Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease". *Neurobiol Dis* 7 (4): 240-250.
- Zhang, M.; Moon, C.; Chan, G.C.; Yang, L.; Zheng, F.; Conti, A.C.; Muglia, L.; Muglia, L.J.; Storm, D.R. y Wang, H. (2008).** "Ca-stimulated type 8 adenylyl cyclase is required for rapid acquisition of novel spatial information and for working/episodic-like memory". *J Neurosci* 28 (18): 4736-4744.
- Zhuang, Y.H.; Sainio, E.L.; Sainio, P.; Vedeckis, W.V.; Ylikomi, T. y Tuohimaa, P. (1995).** "Distribution of all-trans-retinoic acid in normal and vitamin A deficient mice: correlation to retinoic acid receptors in different tissues of normal mice". *Gen Comp Endocrinol* 100 (2): 170-178.
- Zile, M.H. y Cullum, M.E. (1983).** "The function of vitamin A: current concepts". *Proc Soc Exp Biol Med* 172 (2): 139-152.
- Zimmermann, M.B.; Wegmuller, R.; Zeder, C.; Chaouki, N. y Torresani, T. (2004).** "The effects of vitamin A deficiency and vitamin A supplementation on thyroid function in goitrous children". *J Clin Endocrinol Metab* 89 (11): 5441-5447.
- Zingg, J.M. y Azzi, A. (2004).** "Non-antioxidant activities of vitamin E". *Curr Med Chem* 11 (9): 1113-1133.
- Zingg, J.M. (2007a).** "Vitamin E: an overview of major research directions". *Mol Aspects Med* 28 (5-6): 400-422.
- Zingg, J.M. (2007b).** "Molecular and cellular activities of vitamin E analogues". *Mini Rev Med Chem* 7 (5): 543-558.
- Zingg, J.M. (2007c).** "Modulation of signal transduction by vitamin E". *Mol Aspects Med* 28 (5-6): 481-506.
- Zippin, J.H.; Levin, L.R. y Buck, J. (2001).** "CO(2)/HCO(3)(-)-responsive soluble adenylyl cyclase as a putative metabolic sensor". *Trends Endocrinol Metab* 12 (8): 366-370.
- Zola-Morgan, S.; Squire, L.R. y Amaral, D.G. (1986).** "Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus". *J Neurosci* 6 (10): 2950-2967.
- Zucker, R.S. y Regehr, W.G. (2002).** "Short-term synaptic plasticity". *Annu Rev Physiol* 64: 355-405.

## *Anexos*

“La naturaleza nunca hace nada superfluo, nada inútil, y sabe sacar múltiples efectos de una sola causa”.

[Nicolás Copérnico]





## ARTÍCULOS PUBLICADOS

Hasta el momento de su encuadernación, el presente trabajo ha dado lugar a las siguientes publicaciones internacionales:

- **Hernández-Pinto, A.M.; Puebla-Jiménez, L. y Arilla-Ferreiro, E. (2006).** "A vitamin A-free diet results in impairment of the rat hippocampal somatostatinergic system". *Neuroscience* 141 (2): 851-861.
- **Hernández-Pinto, A.M.; Puebla-Jiménez, L. y Arilla-Ferreiro, E. (2009).** "alpha-Tocopherol decreases the somatostatin receptor-effector system and increases the cyclic AMP/cyclic AMP response element binding protein pathway in the rat dentate gyrus". *Neuroscience* 162 (1): 106-117.

Además, durante la realización de la presente Tesis Doctoral, el autor ha participado en otros proyectos que han dado lugar a las siguientes publicaciones internacionales:

- **Burgos-Ramos, E.; Hervás-Aguilar, A.; Aguado-Llera, D.; Puebla-Jiménez, L.; Hernández-Pinto, A.M.; Barrios, V. y Arilla-Ferreiro, E. (2008).** "Somatostatin and Alzheimer's disease". *Mol Cell Endocrinol* 286 (1-2): 104-111.
- **Burgos-Ramos, E.; Puebla-Jiménez, L.; Hernández-Pinto, A. y Arilla-Ferreiro, E. (2009).** "Sulfadiazine partially protects the rat temporal cortex from amyloid Beta Peptide (25-35)-induced alterations of the somatostatinergic system". *Neuroendocrinology* 89 (4): 400-410.
- **Sánchez-Wandelmer, J.; Hernández-Pinto, A.M.; Cano, S.; Dávalos, A.; de la Pena, G.; Puebla-Jiménez, L.; Arilla-Ferreiro, E.; Lasunción, M.A. y Busto, R. (2009).** "Effects of the antipsychotic drug haloperidol on the somatostatinergic system in SH-SY5Y neuroblastoma cells". *J Neurochem* [in press].



## **FINANCIACIÓN**

El presente trabajo ha sido posible gracias a la financiación de los proyectos de investigación que se recogen a continuación:

TÍTULO DEL PROYECTO: “Estudio del sistema somatostatinérgico del sistema nervioso central de la rata Lewis con encefalomiелitis alérgica experimental”.

ENTIDAD FINANCIADORA: DGICYT SAF2003-08052

DURACIÓN: 2004-2007

TÍTULO DEL PROYECTO: “Estudio de los efectos de la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina en la encefalomiелitis autoinmune experimental en la rata”.

ENTIDAD FINANCIADORA: DGICYT SAF2006-09454

DURACIÓN: 2006-2009



## **SUMMARY**

Vitamin A (VA) and vitamin E (VE) are essential liposoluble molecules that participate in the maintenance of several vital functions and whose deficit causes severe disorders. Their physiological actions include the regulation of gene expression, enzyme activity and signal transduction pathways. VA has also been shown to be a cofactor for certain proteins whereas VE is an efficient antioxidant, capable of scavenging free radicals and reactive oxygen species (ROS). In addition, both vitamins participate in the regulation of cellular proliferation, differentiation and cell death. Recent investigations have implicated these vitamins in learning and memory, two processes associated with the hippocampal formation. In rats and mice, for example, VA deficiency causes spatial learning and memory impairment that reverts following VA administration or VA replacement in the diet whereas VE treatment has been shown to alleviate memory loss and other cognitive deficits associated with aging.

It is well established that somatostatin (SST), a peptide neurotransmitter and neuromodulator, plays a pivotal role in the regulation of cognitive processes and in cell proliferation. Cysteamine-induced SST depletion in the hippocampus, for example, causes spatial learning deficits whereas intrahippocampal SST injection facilitates cognitive functions. This neuropeptide enhances the LTP phenomenon in the mossy fiber–CA3 pathway of the hippocampus. More precisely, it has been suggested that somatostatinergic neurons intrinsic to the hippocampal formation are a critical component of a neuronal mechanism controlling the information processing function of the hippocampus. To date, five different SST receptor subtypes (SSTR1-5) have been cloned, all of which couple negatively to adenylate cyclase (AC) via Gi proteins, thus leading to a decrease in the intracellular cyclic AMP (cAMP) levels. Other effectors that also couple to SSTR include: calcium and potassium channels, secretion vesicles, mitogen-activated protein kinases, phospholipase A, phospholipase C and phosphotyrosine phosphatases (PTP).

At present, it is unknown whether the somatostatinergic system is involved in the mechanism of action of vitamins A and E. However, the fact that both vitamins and the somatostatinergic system can regulate cognitive functions and neuronal survival points to this possibility. Hence, the present study was undertaken to evaluate this hypothesis. To this aim, we characterized the effects of VA and VE on different components of the SST signalling



pathway and their possible implication in neuronal survival in the adult rat hippocampus. The hippocampus was chosen for this study due to its role in memory formation and to its high content in both SST-containing neurons and SSTR.

As a model of VA deficiency, male Sprague-Dawley (SD) rats (20 days old) were fed a VA-free diet during 12 weeks, after which the rats were sacrificed by decapitation, whereas a second group of rats was fed with standard laboratory chow (controls). In another group, the same experimental model was used except that the rats were treated with daily intraperitoneal (i.p.) injections of all-trans-retinol (ATR) (150 µg/kg) for 1 week following the 12-week VA-free diet, after which they were sacrificed. As a model of VE deficiency, male SD rats (15 weeks old) were fed a VE-free diet for 9 weeks and were then sacrificed. In another group, the rats were injected daily with  $\alpha$ -tocopherol (200 mg/kg, i.p.) for 1 week following the 9-week VE-free diet, after which they were sacrificed.

To analyze the effects of vitamins A and E or their deficiency on somatostatinergic neurotransmission, we first measured SST expression by measuring SST-like immunoreactive content via radioimmunoassay, SST mRNA levels by reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) and Southern blot and prohormone convertase 2 protein levels by western blot in the hippocampus of the different experimental groups. Next, we measured the binding of  $^{125}\text{I}$ -Tyr<sup>11</sup>-SST-14 to SSTR, the mRNA and protein levels of SSTR1-4 by real-time PCR and western blot, respectively, and the protein expression of the G-protein-coupled receptor kinase isoforms GRK2, GRK5 and GRK6, involved in receptor desensitization and internalization. In order to assess the functionality of these SSTR, we evaluated the activity and expression of two effectors which couple to the SSTR, AC and PTP, as well as the effects of SST on both enzymes. In addition, the expression and functionality of the Gi protein subunits Gi $\alpha$ 1, Gi $\alpha$ 2 and Gi $\alpha$ 3 as well as phosphorylated cAMP response element-binding protein (p-CREB) and total CREB protein content were determined. Since the effects of VA deficiency on oxidative stress have not been well characterized in the hippocampus and oxidative stress can alter the expression and functionality of different intracellular signalling molecules, we also analyzed the antioxidant defence systems in this brain area by measuring superoxide dismutase and catalase activity, lipid peroxidation, and the levels of oxidized and reduced glutathione, in the VA-deficient and ATR-treated rats. Finally, the effects of VA and VE on hippocampal cell death was assessed by the TUNEL technique.



In conclusion, the results obtained in this study demonstrate, for the first time, that VA and VE do not only exert antioxidant effects but can also modulate somatostatinergic neurotransmission in the adult rat hippocampus, suggesting that this system may be implicated in the mechanism of action by which these vitamins regulate cognitive functions and neuronal survival.