

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**EFEECTO DE LA MINOCICLINA Y DE LA SULFADIAZINA
SOBRE LAS ALTERACIONES DEL SISTEMA
SOMATOSTATINÉRGICO CEREBRAL DE LA RATA
INDUCIDAS POR EL PÉPTIDO β -AMILOIDE.**

Tesis doctoral

Emma Burgos Ramos

2006

“La experiencia más hermosa que tenemos a nuestro alcance es el misterio. Es la emoción fundamental que está en la causa del verdadero arte y la ciencia“

Albert Einstein

A mis padres, a mi hermano y a Borja

En este momento, en la tranquilidad del laboratorio delante del ordenador y escribiendo estas líneas, siento que finaliza una etapa de mi vida. A la mente me viene el recuerdo de todas las vivencias, emociones y sentimientos vividos aquí. Esta Tesis Doctoral es el resultado de la ilusión, el esfuerzo, la paciencia y la confianza que han volcado sobre mí las personas que han estado siempre a mi lado, tanto en el ámbito científico como en el personal. A todas ellas se lo agradezco de todo corazón.

Al Dr. Eduardo Arilla Ferreiro, mi director de tesis, quisiera agradecerle profundamente que me abriera las puertas de su laboratorio y me permitiera formar parte de su grupo de investigación. Gracias por dirigirme a lo largo de este camino y ofrecerme siempre su ayuda.

A la Dra. Lilian Puebla Jiménez, mi codirectora de tesis, maestra y sobre todo amiga, nunca podré agradecerle todo lo que me ha ayudado y enseñado a lo largo de este tiempo. Le agradezco haberme transmitido su pasión por la investigación, su forma de ver las cosas y su comprensión. Gracias por tener siempre un momento para escuchar y especialmente por su paciencia y sacrificio.

A mis compañeros David y Alberto por compartir conmigo tanto los éxitos como los fracasos que he obtenido a lo largo de este camino y, sobretodo, por hacerme siempre alguna broma para hacerme reír y levantarme el ánimo en los momentos difíciles. Sois verdaderamente unos magníficos amigos.

A mi compañera Macarena, que aunque su paso por el laboratorio ha sido breve, siempre me ha ayudado de manera incondicional.

A América, por ayudarme en la primera toma de contacto con el laboratorio, lo que permitió el inicio de este trabajo.

Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, por darme la oportunidad de formar parte de su personal investigador y por su gran apoyo humano. Así como a todos los profesores con los que he compartido prácticas y he aprendido de ellos y con ellos. Especialmente a Menchu por sus consejos .

Al personal de los siguientes Servicios de la Universidad:

A José María y a todos los miembros del Centro de Experimentación Animal, por estar siempre dispuestos a ayudarme y enseñarme todo lo necesario para manejar y tratar bien a las ratas.

A Guillermo y Juan, de la Unidad de Tratamientos de Isótopos, por su enorme paciencia y comprensión, sobre todo los días de marcaje.

A Rafa del Servicio de Gestión de la Investigación por resolver siempre con amabilidad mis dudas sobre papeleo burocrático.

Y en especial a Angélica, secretaria del Departamento, por su cordialidad, eficacia y ayuda.

A todos los becarios del Departamento que me han ayudado y, en especial, a María, Ana, Sophie y Nuria por escuchar siempre mis penas y mis alegrías, dejándome siempre su hombro para desahogarme. Gracias chicas por transmitirme calma, paciencia y cariño. Espero que todo os vaya muy bien y que nunca pierda vuestra amistad.

A mis compañeras del final del pasillo: Ana Bajo, Ana Valdehita, Ana Belén y Sandra por ser tan alegres y divertidas y saber animarme en todo momento.

A mi familia, en especial a mis padres, mi hermano y mi novio Borja, por animarme en todo momento a seguir luchando para alcanzar mis objetivos, dándome todo su amor, cariño y ternura. Muchas gracias, sin vosotros nunca hubiera llegada hasta aquí.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is an irreversible neurodegenerative disorder characterized clinically by a progressive cognitive and memory deterioration, with a devastating impact on the whole society. The prevalence of this disease increases logarithmically with age, affecting mainly people over 65 years old. In Spain, it has been calculated to affect around 400,000 people. There is accumulating evidence that the production and accumulation of amyloid-beta ($A\beta$) is central to the pathogenesis of AD. This peptide accumulates in the brain parenchyma, causing the formation of senile neuritic plaques. It has recently been reported that the hydrophobic 11-aminoacid fragment $A\beta$ (25-35) is the most toxic portion of the full-length peptide. In addition, several studies suggest that this fragment could be produced in humans by racemization of the $A\beta$ (1-40) or $A\beta$ (1-42) peptides. At the neurochemical level, an impairment of several neurotransmitter signal transduction pathways have been reported, including the cholinergic, adrenergic and dopaminergic systems. These alterations affect the associative brain areas and part of the limbic system, thus leading to the cognitive, behavioural and emotional manifestations characteristic of the disease. Several authors have also described a significant reduction in the somatostatin (SRIF) content in the post-mortem human brain as well as in the cerebrospinal fluid of AD patients. However, it is presently unknown whether this decrease is caused directly by $A\beta$.

Somatostatin (SRIF) is a tetradecapeptide widely distributed throughout the central nervous system (CNS) and peripheral tissues. Several studies have revealed that it plays a pivotal role as a neuromodulator and neurotransmitter, participating in the control of learning and memory processes. SRIF exerts its biological actions via binding to specific high-affinity membrane receptors which belong to the G-protein-coupled receptor superfamily. To date, the genes for five SRIF receptor subtypes designated sst1-sst5 have been cloned. All five sst subtypes couple negatively to adenylyl cyclase (AC) via G_i proteins, leading to a reduction in the levels of the second messenger cyclic AMP (cAMP). In addition, some sst couple to calcium channels, potassium channels, secretion vesicles, mitogen-activated protein kinases (MAPK), phospholipase C (PLC) or phospho-tyrosine phosphatases.

At present, it is unknown whether $A\beta$ is capable of altering the SRIF receptor-effector system in the rat brain. Hence, the present study was undertaken to analyze the effects of $A\beta$ (25-35) on this system in the rat hippocampus as well as the rat frontal, parietal and temporal cortices. With this aim, we measured SRIF-like immunoreactivity (SRIF-LI) content by radioimmunoassay (RIA) and SRIF gene expression by measuring SRIF mRNA levels, using the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), as well as the protein levels of phosphorylated-CREB (p-CREB) by western blotting, in control rats and $A\beta$ (25-35)-treated rats. In order to evaluate the functionality of the somatostatinergic system, we measured the binding of $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$ to SRIF receptors, basal and forskolin-stimulated AC activity and the capacity of SRIF to inhibit both activities in membranes derived from the above-mentioned brain areas in control and $A\beta$ (25-35)-treated rats. In addition, the protein levels of sst1-sst4, of the G_i protein subunits $G_{i\alpha 1}$, $G_{i\alpha 2}$ and $G_{i\alpha 3}$, as well as those of the G-protein-coupled receptor kinase GRK2 were

determined by western blotting using specific antibodies. Finally, the sst2 mRNA levels were also determined by RT-PCR in these experimental groups.

Tetracyclines have been demonstrated not only to inhibit the formation of A β aggregates *in vitro* but to disassemble preformed fibrils as well. Consequently, it was of interest to analyze whether minocycline, a semisynthetic second-generation tetracycline, is capable of protecting the somatostatinergic system *in vivo* from A β toxicity, given its anti-amyloidogenic activity. On the other hand, administration of the antibiotic sulphadiazine to the elderly has been reported to produce a psychic and physical amelioration. In view of this fact, we proposed to analyze whether sulphadiazine could prevent the A β (25-35)-induced effects on the somatostatinergic system in the rat temporal cortex. We thus examined the effects of both drugs on the above-mentioned parameters in control rats and rats treated chronically with A β (25-35).

In order to partially reproduce AD in experimental animals, male Wistar rats weighing 200-250 g were used in the study. A β (25-35) was dissolved in 1% acetic acid and administered intracerebroventricularly (icv) to the rat in a single dose (10 μ g) or continuously via an osmotic minipump implanted in the left brain ventricle (300 pmol/day) for 14 days. Minocycline was dissolved in saline and was injected intraperitoneally twice daily (45 mg/Kg) 24 hours prior to A β (25-35) administration. An additional dose of 22,5 mg/kg/day was administered during the last two days of the A β (25-35) infusion. In another group of rats, the same experimental model was used except that sulphadiazine (instead of minocycline) was administered intragastrically at a dose of 160 mg/Kg twice daily. A second dose of 80 mg/Kg/day was administered during the last two days of the A β (25-35) infusion. All rats were sacrificed by decapitation 24 hours following the last injection.

In conclusion, the present results demonstrate for the first time that A β (25-35) decreases the activity of the somatostatinergic system in the rat hippocampus, frontal cortex, parietal cortex and temporal cortex. In addition, it reveals that both minocycline and sulphadiazine treatments prevent the A β (25-35)-induced impairment of the somatostatinergic system in the rat temporal cortex. Consequently, these results suggest that minocycline and sulphadiazine might have a beneficial effect in AD treatment in humans.

ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

A β : Péptido β -amiloide

AC: Adenilato ciclase

ACE: Enzima convertidora de angiotensina

ACTH: Corticotropina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

AICD: Dominios intracelulares de la PPA

α PPAs: Porción α -soluble de la PPA

AMPc: Adenosín 3',5'-monofosfato cíclico

ApoE: Apolipoproteína E

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosómico

ATP: Adenosín 5'-trifosfato

β PPAs: Porción β -soluble de la PPA

BSA: Albúmina sérica bovina

CBP: Proteína de unión a CREB

CDK: Quinasa dependiente de ciclina

CHO: Células ováricas de hámster chino

CK: Creatín quinasa

CP: Creatín fosfato

CRE: Elemento de respuesta a AMPc

CREB: Proteína de unión a CRE

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

DAG: Diacilglicerol

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTPs: Desoxirribonucleótidos

EA: Enfermedad de Alzheimer

ECE: Enzima convertidora de endotelina

EDTA: Ácido etilendinitrilotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ERE: Elemento de respuesta a estrógenos

ERK: Quinasa regulada por la señal extracelular

ERT: Elemento de respuesta a hormonas tiroideas

FK: Forskolina

GABA: Ácido gamma-amino butírico

GDP: Guanosín 5'-difosfato

GH: Hormona de crecimiento

GPCR: Familia de receptores acoplados a proteínas G

GRE: Elemento de respuesta a glucocorticoides

GRK: Quinasas de los GPCRs

GSK3: Quinasa de la glucógeno sintasa

GTP: Guanosín 5'-trifosfato

HEPES: Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-etanosulfónico

IBMX: 3-Isobutil-1-metilxantina

i.c.v.: Intracerebroventricular

IDE: Enzima degradante de insulina

IL: Interleuquina

iNOS: Enzima NOS inducible

i.p.: Intraperitoneal

IP3: Inositol-1,4,5-trifosfato

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LTP: Potenciaciones a largo plazo

MAP: Proteínas asociadas a microtúbulos

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos



MOPS: Ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico

NO: Oxido nítrico

NOS: Enzima óxido nítrico sintasa

NPY: Neuropeptido Y

ONF: Ovillos neurofibrilares

PC: Endoproteasas conversoras de propéptidos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

p-CREB: Proteína CREB fosforilada

PI3-K: Fosfoinositido-3-quinasa

PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKA: Proteína quinasa dependiente de AMPc

PKC: Proteína quinasa dependiente de calcio

PLA₂: Fosfolipasa A₂

PLC: Fosfolipasa C

PLD: Fosfolipasa D

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PNS: Placas neuríticas seniles

PPA: Proteína precursora de amiloide

PPA-tg: ratones transgénicos para la PPA

PS: Presenilina

PTPs: Fosfotirosinas fosfatasas

PTX: Toxina pertús

RT: Transcripción inversa

SAC: Adenilato ciclasa soluble

SDS: Dodecil sulfato sódico

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

SRIF: Somatostatina

SRIF-IR: Somatostatina inmunorreactiva

sst: Receptores de somatostatina

STI: Inhibidor de tripsina de soja

TEA: Trietanolamina

TEMED: N,N,N',N'-

Tetrametiletildiamina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TRH: Hormona liberadora de tirotropina

TSH: Hormona estimuladora de tiroides

ÍNDICE



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Enfermedad de Alzheimer	1
1. 1. Marco histórico	1
1. 2. Sintomatología	1
1. 3. Alteraciones estructurales	2
1. 3. 1. Placas neuríticas seniles	2
1. 3. 1. 1. Procesamiento de la proteína precursora de amiloide. Origen del péptido β -amiloide	2
1. 3. 1. 2. Metabolismo del péptido β -amiloide	6
1. 3. 2. Ovillos neurofibrilares	7
1. 3. 2. 1. Proteína tau	8
1. 4. Alteraciones genéticas	9
1. 4. 1. Mutaciones en el gen de la proteína precursora de amiloide	9
1. 4. 2. Mutaciones en el gen de las presenilinas 1 y 2	10
1. 4. 3. Polimorfismo del gen de la apolipoproteína E	11
1. 5. Alteraciones neuroquímicas	11
1. 5. 1. Neurotransmisores y receptores de neurotransmisores	11
1. 5. 1. 1. Sistema colinérgico	11
1. 5. 1. 2. Sistema adrenérgico	12
1. 5. 1. 3. Otros sistemas de neurotransmisión	12
1. 5. 2. Efectores	13
1. 6. Tratamiento y prevención de la Enfermedad de Alzheimer	14
2. Sistema somatostatinérgico	16
2. 1. Descubrimiento de la somatostatina	16
2. 2. Estructura de la somatostatina	16
2. 3. Biosíntesis de la somatostatina	17
2. 4. Estructura y regulación del gen de la somatostatina	19
2. 5. Distribución de la somatostatina	20
2. 5. 1. Distribución en el sistema nervioso central	20
2. 6. Acciones biológicas de la somatostatina	22
2. 6. 1. Tejidos periféricos	22
2. 6. 2. Sistema nervioso central	23
3. Mecanismo de acción de la somatostatina	24
3. 1. Receptores de somatostatina	24
3. 2. Estructura de los genes de los receptores de somatostatina	26
3. 3. Regulación de los receptores de somatostatina	28
3. 3. 1. Regulación dependiente de agonista	28
3. 3. 2. Regulación de la expresión de los genes de los receptores de somatostatina	29
3. 4. Distribución de los receptores de somatostatina	30
3. 4. 1. Sistema nervioso central	30
3. 4. 2. Tejidos periféricos	31



4. Sistemas de transducción de señales acoplados a los receptores de somatostatina	31
4. 1. Proteína G	31
4. 2. Efectores	33
4. 2. 1. Adenilato ciclasa	33
4. 2. 2. Canales de potasio	35
4. 2. 3. Canales de calcio	36
4. 2. 4. Vesículas de secreción	37
4. 2. 5. Bomba de Na ⁺ /H ⁺	38
4. 2. 6. Fosfotirosina fosfatasa	38
4. 2. 7. Fosfolipasa C	40
OBJETIVOS	42
MATERIALES Y MÉTODOS	44
1. Reactivos	44
2. Animales y modelos de experimentación	47
2. 1. Animales de experimentación	47
2. 2. Modelos de experimentación de la Enfermedad de Alzheimer	47
2. 2. 1. Modelo agudo	47
2. 2. 2. Modelo crónico	47
2. 3. Tratamientos	48
3. Extracción y disección del cerebro	49
3. 1. Extracción del encéfalo	49
3. 2. Disección del cerebro	49
4. Preparación de muestras biológicas	51
4. 1. Obtención de membranas cerebrales	51
4. 2. Obtención de la fracción soluble	51
4. 2. 1. Reactivos	51
4. 2. 2. Método	52
5. Determinación de la somatostatina tisular	52
5. 1. Extracción de la somatostatina tisular	52
5. 2. Determinación de la concentración de somatostatina tisular	52
5. 2. 1. Reactivos	52
5. 2. 2. Método	52
6. Marcaje de Tyr¹¹-somatostatina-14 con NaI¹²⁵	53
6. 1. Preparación de reactivos	53
6. 2. Preparación de la columna	54
6. 3. Marcaje	54
6. 4. Purificación	54
6. 5. Test de incorporación a talco	55



7. Ensayos de unión de la somatostatina a sus receptores específicos en membranas de hipocampo, corteza frontal, parietal o temporal	56
7. 1. Reactivos	56
7. 2. Método	56
8. Inmunodetección de proteínas	57
8. 1. Reactivos	57
8. 2. Método	58
9. Estudio de la actividad adenilato ciclasa	60
9. 1. Reactivos	60
9. 2. Método	64
10. Análisis del ARN de la somatostatina y del subtipo sst2	65
10. 1. Extracción de ARN y digestión con DNasa I	65
10. 1. 1. Reactivos	65
10. 1. 2. Método	66
10. 2. Integridad del ARN	67
10. 2. 1. Reactivos	67
10. 2. 2. Método	67
10. 3. Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa	68
10. 3. 1. Transcripción inversa	68
10. 3. 2. Reacción en cadena de la polimerasa	68
RESULTADOS	70
1. Hipocampo	70
1. 1. Modelo agudo	70
1. 2. Modelo crónico	73
2. Corteza frontoparietal	80
2. 1. Modelo agudo	80
2. 2. Modelo crónico	83
3. Efecto del Aβ(35-25) sobre el sistema somatostatinérgico en el hipocampo y corteza cerebral de la rata	88
4. Efecto de la infusión crónica del Aβ(25-35) y del tratamiento con minociclina sobre el sistema somatostatinérgico en la corteza temporal de la rata	90
4. 1. Efecto de la administración del A β (25-35) y de la minociclina sobre la expresión de la somatostatina	90
4. 2. Efecto de la administración del A β (25-35) y de la minociclina sobre los niveles proteicos de neprilisina	92
4. 3. Efecto de la administración del A β (25-35) y de la minociclina sobre los receptores de somatostatina	93
4. 4. Efecto de la administración del A β (25-35) y de la minociclina sobre la vía de señalización de la enzima adenilato ciclasa	98



5. Estudio del efecto de la sulfadiazina sobre las alteraciones del sistema somatostatinérgico producidas por el Aβ(25-35) en la corteza temporal de la rata	101
DISCUSIÓN	106
CONCLUSIONES	131
ARTÍCULOS PUBLICADOS	134
BIBLIOGRAFÍA	135

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1. 1. Marco histórico

La enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por primera vez en 1907 por Alois Alzheimer en una paciente de 51 años, que presentaba un cuadro de demencia, alteraciones de la memoria y apraxia. Tras su fallecimiento, Alzheimer examinó su cerebro, observando la existencia de placas neuríticas seniles (PNS), ovillos neurofibrilares (ONF) y pérdida neuronal. Las PNS aparecieron en el parénquima cerebral y en la pared de los vasos sanguíneos de las leptomeninges. Estos hallazgos permitieron, por primera vez, separar esta demencia de las alteraciones producidas por el mero envejecimiento. En base a ello, la EA se define como un trastorno neurodegenerativo irreversible del sistema nervioso central (SNC) que se caracteriza clínicamente por una demencia progresiva.

En la actualidad, debido al envejecimiento progresivo de la población de los países desarrollados, y al incremento de la incidencia de este proceso con la edad, la EA constituye uno de los principales problemas de la salud pública. Por ello, se prevé un incremento muy importante de la prevalencia de esta enfermedad en los próximos años. Se calcula que existen ya en el mundo 12 millones de individuos de mediana y avanzada edad que están afectados por esta enfermedad. En nuestro país, la EA constituye la cuarta causa de mortalidad.

1. 2. Sintomatología

El paciente con EA, presenta una combinación de síntomas que incluyen alteraciones cognitivas, conductuales y neurológicas. Los trastornos cognitivos se caracterizan por el deterioro precoz y progresivo de la memoria, manifestado por la incapacidad para adquirir nueva información y para recordar datos ya adquiridos. Cuando el déficit cognitivo se agrava, el paciente está desorientado temporalmente, presenta alteraciones del lenguaje, como pérdida de vocabulario o incomprensión de palabras comunes, y es incapaz de razonar frente a determinadas situaciones o problemas. Las alteraciones conductuales incluyen agresividad, delirios, depresión, alucinaciones, cambios en el ritmo del sueño despertándose frecuentemente y pérdida del control de los esfínteres. Por último, las anomalías neurológicas se manifiestan mediante la aparición de un aumento del tono muscular, dificultando los movimientos de las extremidades. En algunos



casos pueden aparecer crisis epilépticas. Todos estos síntomas están asociados a una serie de alteraciones estructurales, genéticas y neuroquímicas que afectan a la mayoría de los centros cognitivos, tales como el lóbulo temporal, el hipocampo y parte del sistema límbico, así como las áreas de asociación presentes en la corteza frontal y parietal (Arendt , 2001).

La enfermedad se clasifica en dos tipos principales, según la edad a la que aparecen los síntomas:

- 1) Enfermedad de Alzheimer presenil o de aparición precoz: cuando los síntomas se manifiestan antes de los 65 años.
- 2) Enfermedad de Alzheimer o aparición tardía: si la enfermedad se manifiesta después de los 65 años.

Por otro lado, la enfermedad puede ser familiar o esporádica, dependiendo de si existen o no antecedentes. La mayoría de los pacientes con la forma familiar presentan síntomas de EA presenil, mientras que la EA de aparición tardía suele darse en casos esporádicos (Rossor y col., 1996).

1. 3. Alteraciones estructurales

1. 3. 1. Placas neuríticas seniles

Existen dos tipos de placas, las PNS y las placas difusas, ambas reconocidas en el cerebro de pacientes con EA (Gomez-Isla y col., 1997). Las PNS son depósitos extracelulares esféricos, de diámetro variable (50 a 200 μm), constituidos por un núcleo central amiloideo rodeado de neuritas distróficas. Estas neuritas contienen astrocitos, microglia y restos de lisosomas, mitocondrias y vesículas sinápticas, resultantes del daño neuronal adyacente (Dennis y Dickson, 1997). Las placas difusas representan el estadio temprano de la formación de las PNS, ya que aunque no presentan un núcleo amiloideo ni neuritas distróficas, contienen una pequeña porción de péptido amiloide (Gowing y col., 1994).

1. 3. 1. 1. Procesamiento de la proteína precursora de amiloide. Origen del péptido β -amiloide.

En 1984 se aisló y secuenció el componente fundamental de las PNS, un péptido de 40 ó 42 aminoácidos, que se denominó péptido β -amiloide ($A\beta$) (Glennner y Wong, 1984). Este péptido proviene de la hidrólisis alternativa de la proteína precursora de amiloide (PPA). La PPA



es una proteína transmembrana con un largo segmento amino-terminal extracelular y un corto segmento carboxilo-terminal intracelular, cuyo gen se localiza en el cromosoma 21. Este gen se expresa en muchos tipos de células y tejidos, entre ellos, células endoteliales, células gliales y neuronas del cerebro (Schmechel y col., 1988). A nivel celular, la PPA se localiza en la mayoría de las estructuras membranosas de la célula, tales como el retículo endoplasmático, compartimentos del aparato de Golgi, vesículas de secreción, endosomas y en la membrana plasmática (Schubert y col., 1991). Estudios de biología celular han demostrado que la PPA también se encuentra en las terminaciones axonales de las neuronas, puesto que se ha observado un transporte retrógrado entre el soma y el axón de vesículas con dicha proteína (Yamazaki y col., 1995).

La PPA pertenece a un grupo heterogéneo de polipéptidos (Selkoe y col., 1988). Esta heterogeneidad se debe a que una vez transcrito el gen de la PPA, el ácido ribonucleico (ARN) mensajero (ARNm) sufre un procesamiento alternativo, dando origen a tres isoformas denominadas PPA₇₇₀, PPA₇₅₁ y PPA₆₉₅ (el subíndice indica el número de aminoácidos que lo forman) (Weidemann y col., 1989). En las células nerviosas, se expresa mayoritariamente la isoforma formada por 695 aminoácidos, mientras que en el resto de las células se expresan las isoformas PPA₇₅₁ y PPA₇₇₀ (Haass y col., 1991). Una vez sintetizada la PPA en el retículo endoplasmático rugoso, ésta migra al aparato de Golgi donde se modifica estructuralmente mediante procesos de sulfatación, fosforilación o adición de azúcares, llegando finalmente a la membrana plasmática mediante vesículas de secreción (Oltersdorf y col., 1990; Walter y col., 1997).

No se conoce con exactitud la función que desempeña la PPA, aunque se ha descrito que actúa como un inhibidor de proteasas en neuronas, permitiendo perpetuar las sinapsis establecidas. Además, presenta un papel neurotrófico, estimula el crecimiento celular en cultivos y participa en la adhesión celular, ya que se han encontrado en la PPA dominios de unión específicos para laminina, integrina 1- β , heparina y colágeno (Turner y col., 2003). Asimismo, el grupo de investigación de Okamoto y col. (1995) encontró vesículas en las que la PPA₆₉₅ interactuaba con proteínas reguladoras que unen nucleótidos de guanina (proteínas G), por lo que postularon que la PPA podría funcionar como un receptor acoplado a proteínas G, participando así en la comunicación intercelular y en la vía de señalización entre la membrana y el núcleo.



El metabolismo normal de la PPA en las células se denomina vía no amiloidogénica. La PPA se hidroliza mediante la acción de una metaloproteasa, denominada α -secretasa, que escinde la porción extracelular de la molécula por el dominio más próximo a la superficie de la membrana, produciendo un fragmento denominado porción α -soluble de la PPA (α PPAs). Este fragmento se secreta al espacio extracelular donde actúa como un factor autocrino y neuroprotector, mejorando la sinapsis y la supervivencia celular. El fragmento carboxilo-terminal C83 queda en la membrana. Existe un metabolismo alternativo en el que participa una primera enzima aspartil-proteasa, denominada β -secretasa o BACE, cuya actividad esta incrementada en la EA (Fukumoto y col., 2002). Esta enzima realiza un corte distal en el extremo N-terminal, dando lugar a la porción β -soluble de la PPA (β PPAs), que se libera al espacio extracelular, y al fragmento carboxilo-terminal C99, que permanece en la membrana. La β PPAs participa en la modulación de la adhesión celular y regulación de la proliferación celular (Mattson, 1997). Una segunda enzima, la γ -secretasa, un complejo formado por las proteínas presenilinas (PS1 o PS2), Aph-1, nicastrina y Pen-2, (Siman y Salidas, 2004) hidroliza los fragmentos C83 y C99 por el dominio intramembranal, liberando al espacio extracelular un fragmento insoluble de 3 kDa denominado P3 o $A\beta(17-42)$, en el caso de C83, y el $A\beta$ de 40 ó 42 aminoácidos en el caso de C99. En ambos casos se liberan al citosol los dominios intracelulares de la PPA (AICD) que actúan como factores de transcripción en el núcleo (Turner y col., 2003) (Figura 1).

La neurotoxicidad del $A\beta$ fue demostrada por primera vez por Yankner y col., (1990) en cultivos de neuronas hipocampales diferenciadas, al observar que el $A\beta$ inducía la retracción de axones y dendritas seguido de la muerte neuronal. Numerosos estudios han demostrado que el $A\beta$ es neurotóxico sólo cuando se agrega formando fibrillas amiloidogénicas (Pike y col., 1991, 1993; Lorenzo y Yankner, 1994). El $A\beta$ se agrega en condiciones de alta hidrofobicidad, provocando un cambio conformacional en el péptido. Primero se agregan los oligómeros del $A\beta$, dando lugar a las protofibrillas que se ensamblan formando las fibrillas insolubles de conformación hoja β -plegada, que a su vez se agrupan constituyendo parte de las PNS. Las PNS están constituidas tanto por el $A\beta(1-40)$ como por el $A\beta(1-42)$, aunque éste último se encuentra en mayor proporción dado que es muy hidrofóbico y presenta un mayor potencial de agregación. Por lo tanto, este fragmento hace de núcleo sobre el que se deposita el $A\beta(1-40)$ (Gandy, 2005). Además, se ha descrito que en la secuencia de aminoácidos del $A\beta$ existen varios dominios



funcionales, entre los que cabe destacar el dominio de agregación, de neurotoxicidad y de unión a la superficie celular (Yamada y Nabeshima, 2000) (Figura 2).

Por otro lado, las placas amiloides difusas presentes en la EA están constituidas principalmente por el fragmento P3 (Gowing y col., 1994). Estudios *in vitro*, revelan que este fragmento induce apoptosis neuronal en la EA (Wei y col., 2002)

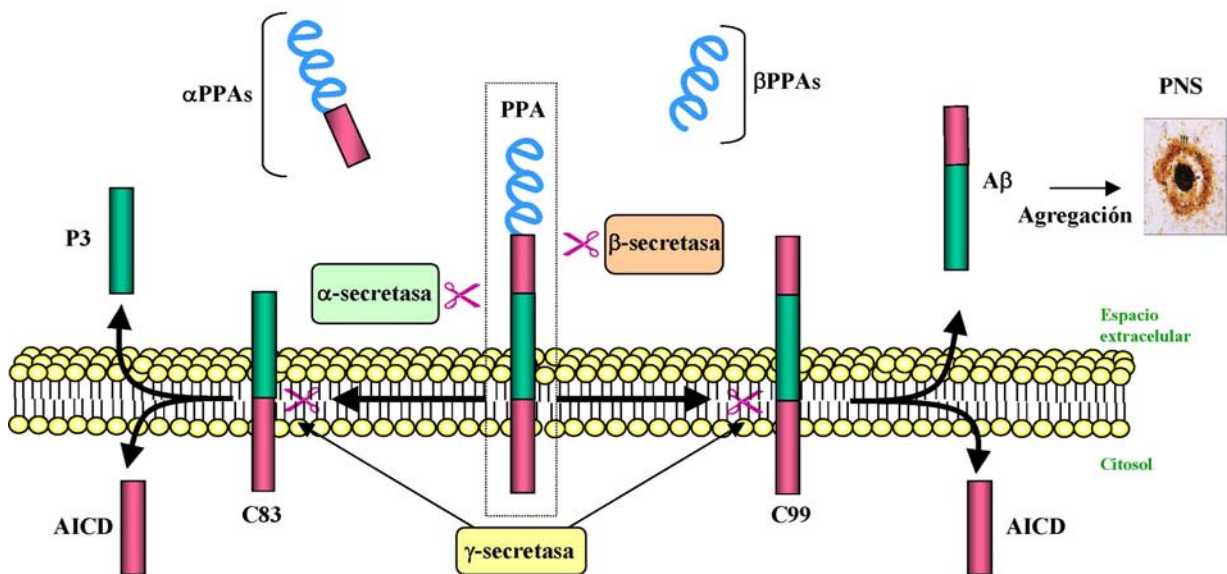


Figura 1. Procesamiento de la proteína precursora de amiloide (PPA), a través de la vía no amiloidogénica y vía amiloidogénica. La actividad α -secretasa se encuentra en la superficie celular, en las vesículas secretoras y en el aparato de Golgi. La actividad β -secretasa se encuentra en vesículas secretoras y endosomas mientras que la actividad γ -secretasa depende del tipo celular, aunque normalmente se encuentra en el aparato de Golgi y en los endosomas. α PPAs: porción α -soluble de la PPA, β PPAs: porción β -soluble de la PPA, AICD: dominios intracelulares de la PPA y A β : péptido β -amiloide.

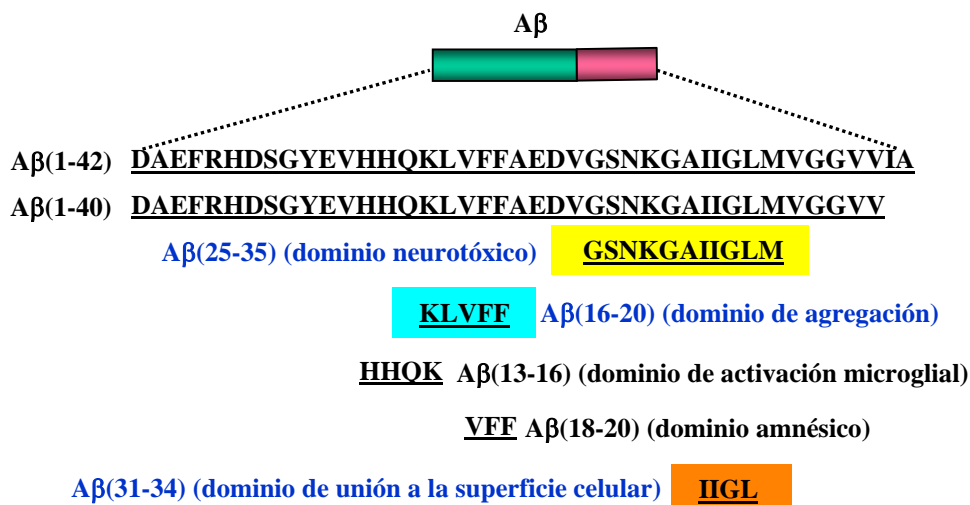


Figura 2. Secuencia de aminoácidos del A β (1-42) y del A β (1-40), incluidos sus dominios funcionales.



1. 3. 1. 2. Metabolismo del péptido β -amiloide

En contra de lo que se postuló inicialmente, el procesamiento de PPA se produce en el metabolismo normal de cualquier célula, tanto por la vía no amiloidogénica como por la vía amiloidogénica. Seubert y col. (1992) detectaron que el $A\beta$ está presente tanto en líquido cefalorraquídeo (LCR) como en el plasma de sujetos sanos. La forma soluble del $A\beta(1-40)$, es la que se produce mayoritariamente durante el metabolismo normal de las células. Sin embargo, la producción mayoritaria del $A\beta(1-42)$ está asociada a procesos patológicos, como en la EA (Scheuner y col., 1996). Por ello, el $A\beta$ es un producto metabólico normal, que es constantemente anabolizado y catabolizado en el cerebro (Seubert y col., 1993) y cuyos niveles estacionarios están determinados por el balance metabólico entre ambos procesos. Alteraciones en este balance durante un largo período de tiempo podría provocar la aparición de depósitos amiloideos, causando un aumento de la incidencia y desarrollo de la EA, ya que tanto un aumento del anabolismo como una disminución de la actividad de las enzimas que degradan el $A\beta$, favorecen la formación de PNS (Selkoe, 2001) (Figura 3).

Se han descrito una gran variedad de peptidasas capaces de degradar el $A\beta$ *in vitro* como son la gelatinasa A y B, neprilisina, enzima degradante de insulina (IDE), catepsina D, factor de coagulación XI, plasmina, enzima convertidora de angiotensina (ACE) y la enzima convertidora de endotelina (ECE-1). Sin embargo, no estaba claro cual de estas enzimas ejercía un papel predominante en el catabolismo del $A\beta$ *in vivo* en el cerebro. Recientemente, mediante la utilización de ratones *knockout* para neprilisina, inhibidores de la neprilisina (tiorfano y fosforamidona) y anticuerpos específicos para la neprilisina, se ha demostrado que esta es la enzima encargada de degradar mayoritariamente el $A\beta$ en el cerebro *in vivo* (Takaki y col., 2000). La neprilisina es una metalopeptidasa de membrana de tipo II formada por aproximadamente 750 residuos, con un corto segmento amino-terminal citosólico y un largo segmento carboxilo-terminal extracelular. Dicha enzima funciona en la superficie celular, donde se libera el $A\beta$; es capaz de hidrolizar el $A\beta(1-40)$, el $A\beta(1-42)$ y sus formas oligoméricas (Shirotani y col., 2001; Kanemitsu y col., 2003). Además, se ha observado que existe una relación inversa entre la localización de los depósitos del $A\beta$ y la distribución de la neprilisina en el cerebro. A nivel subcelular, la neprilisina se localiza en la membrana plasmática de axones y algunas dendritas neuronales, lo que sugiere que después de su síntesis en el soma, la neprilisina migrará a las terminaciones presinápticas, lugar donde se sintetiza mayoritariamente el $A\beta$ (Iwata y col., 2004).

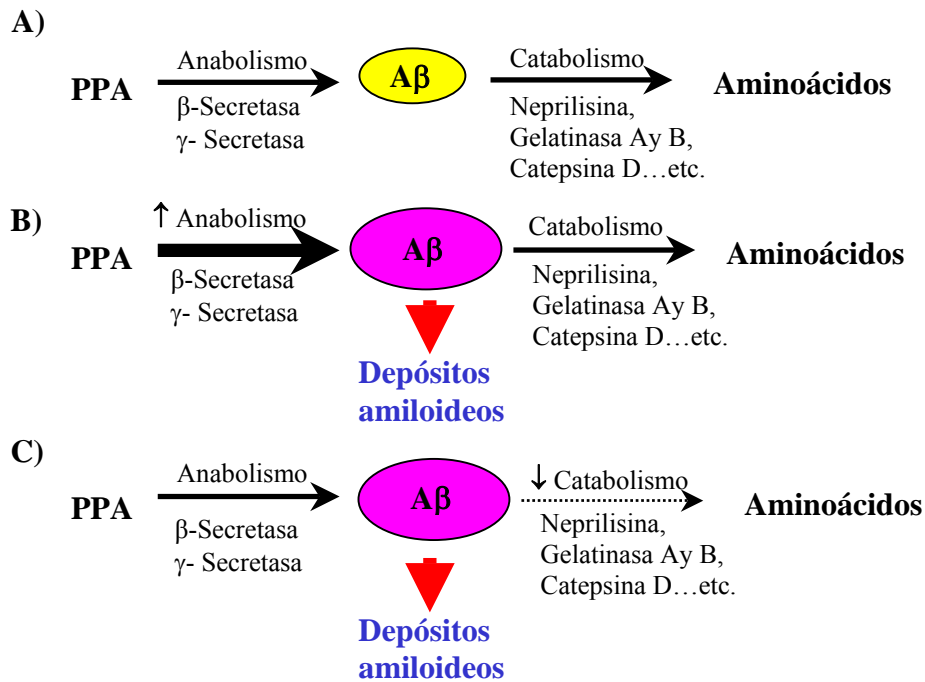


Figura 3. Metabolismo del péptido β-amiloide *in vivo* (A). Un aumento del anabolismo (B) o disminución del catabolismo (C) aceleran la producción y agregación del Aβ.

Por otro lado, diversos trabajos realizados en ratones de avanzada edad, han revelado que los niveles de neprilisina en el cerebro disminuyen durante el envejecimiento, favoreciendo así la aparición de las PNS. Además se ha observado que esta disminución empieza a aparecer en las mismas áreas cerebrales en las que se manifiesta inicialmente la neurodegeneración característica de los estadios tempranos de la EA (Braak y Braak, 1991).

En base a todas estas observaciones, se puede establecer que la neprilisina, junto con el Aβ, posee un papel relevante en la patogénesis de la EA.

1. 3. 2. Ovillos neurofibrilares

Los ONF son depósitos intracelulares formados por un componente proteico y otro no proteico que está formado principalmente por glucosaminoglicanos (heparanes, condroitines o queratanes), polianiones y ácidos grasos. El componente proteico está constituido mayoritariamente por la proteína tau hiperfosforilada. Estos ONF son característicos de la degeneración fibrilar presente en la EA y otras enfermedades como la demencia frontotemporal, la enfermedad de Parkinson ligado al cromosoma 17, el síndrome de Down y la degeneración corticobasal. En cada una de estas tauopatías, los ONF se forman en áreas cerebrales distintas,



apareciendo en el citoplasma de neuronas o células gliales. En la EA, los ONF aparecen inicialmente en las neuronas del lóbulo temporal y parietal de la corteza, afectando posteriormente al hipocampo y otras áreas de asociación. Mediante diversos estudios, se ha establecido una relación lineal entre el número de ONF existentes en el SNC y el grado de demencia presente en la EA (Arraigada y col., 1992).

1. 3. 2. 1. Proteína tau

La proteína tau es una proteína neuronal hidrofílica que pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP). En la especie humana, el gen de esta proteína se encuentra situado en el cromosoma 17. Existe una gran variedad de isoformas de tau en el SNC, debido al procesamiento alternativo que sufre su ARNm y a las modificaciones postraduccionales a la que es sometida la proteína (fosforilación y glicosilación). En condiciones normales, la proteína tau facilita el ensamblaje de la tubulina, estabilizando la organización de los microtúbulos, lo que permite mantener las prolongaciones citoplasmáticas típicas de las células nerviosas (Weingarten y col., 1975). Cuando la proteína tau está hiperfosforilada, se produce un cambio conformacional en la molécula que impide su unión a los microtúbulos, desestabilizándolos y favoreciendo la agregación de dicha proteína. Este cambio conformacional, consiste en un aumento de estructuras α -hélice en la proteína tau hiperfosforilada, permitiendo que se agregue formando pares de filamentos helicoidales (Goux, 2002).

El proceso de fosforilación no sólo es importante en la formación de los ONF en las tauopatías sino que también es necesario en condiciones normales para permitir la unión de la proteína tau a los microtúbulos. La fosforilación de tau se produce en residuos de serina o treonina seguidos o no de una zona rica en prolina. La fosforilación en residuos de serina se produce en la región de unión de tau a los microtúbulos mientras que la fosforilación en residuos de treonina no afecta a esta región de unión. *In vitro*, la proteína tau puede ser fosforilada por una gran variedad de quinasas tales como: quinasas de las MAP, quinasas de estrés, proteína quinasa dependiente de adenosín 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) (PKA), proteína quinasa dependiente de calcio (PKC), calmodulina, quinasa de la glucógeno sintasa (GSK3) y quinasa dependiente de ciclina (CDK5). Sin embargo, se desconoce cual de estas quinasas es responsable de iniciar la fosforilación *in vivo*. Recientemente, se ha demostrado que la GSK3 participa en la fosforilación de tau tanto en condiciones normales como en situaciones patológicas (Ávila y col., 2004). En la EA, se ha detectado que el A β es capaz de incrementar la fosforilación de tau



mediada por la GSK3, favoreciendo su agregación. Se ha planteado que este aumento podría deberse a la acción antagónica que ejercería el A β sobre los receptores de insulina, promoviendo la activación de la GSK3 (Xie y col., 2002).

Por otro lado, el desensamblaje de los microtúbulos provocado por la hiperfosforilación de tau, provoca cambios en el armazón celular así como en la localización y organización de estructuras subcelulares tales como las mitocondrias y los lisosomas, lo que conlleva una interrupción de la sinapsis y una inducción de la muerte neuronal por apoptosis (Alonso y col., 1997).

1. 4. Alteraciones genéticas

El avance de los conocimientos sobre el procesamiento proteolítico de la PPA y el estudio genético de familias con EA, han permitido guiar la búsqueda de alteraciones genéticas que causan o predisponen al desarrollo de la EA. A su vez, estos estudios han permitido profundizar en la comprensión del mecanismo patogénico de esta enfermedad neurodegenerativa y descifrar la relación genotipo-fenotipo presente en la EA familiar. Aunque la genética de esta enfermedad es enormemente heterogénea, se han identificado cuatro genes implicados en su desarrollo: el gen de la PPA, de la presenilina 1 (PS1), de la PS2 y de la apolipoproteína E (ApoE). La presencia de mutaciones o polimorfismos en estos genes produce un incremento de la producción y agregación del A β en el cerebro, induciendo un aumento del daño neuropatológico clásico de la EA (Selkoe, 1997).

Ante todo, hay que tener en cuenta que estas alteraciones genéticas son un factor de riesgo, que confieren al individuo que las porta predisposición a desarrollar la EA, pero no son la única causa necesaria, ni suficiente, para padecer la enfermedad.

1. 4. 1. Mutaciones en el gen de la proteína precursora de amiloide

Se estima que hay muy pocas familias en el mundo afectadas por estas mutaciones en el gen de la PPA, aproximadamente un 0,4 % de los casos de EA, aunque sus manifestaciones neuropatológicas son muy severas. En estas familias, la edad de aparición de la EA oscila entre los 40 y los 65 años.

Hasta el momento, se han identificado nueve mutaciones en el gen de la PPA, que se localiza en el cromosoma 21, cada una de las cuales posee una localización estratégica dentro del gen. La mayoría de estas mutaciones están próximas al dominio de corte de la β -secretasa. Esto



inducirá un aumento de la actividad de la enzima, generando más A β (1-40) y A β (1-42). El resto de las mutaciones se localizan en el extremo carboxilo-terminal, cerca del sitio de corte de la γ -secretasa, o dentro de la secuencia que da origen al A β . En resumen, todas estas mutaciones conducirán, al final, a un aumento en la producción del A β , especialmente del A β (1-42) (Goate y col., 1991).

Recientemente, se ha sugerido que cambios en la expresión de la PPA podría también predisponer al desarrollo de las neuropatologías características de la EA, como sucede en el caso del Síndrome de Down. En la trisomía 21 se produce un aumento de la carga génica, lo que conlleva el incremento de la expresión de la PPA y, por tanto, de la producción del A β . Esto explica la formación temprana de las PNS y pérdida de memoria que se manifiesta en estos enfermos durante los 20 y 30 años de edad (Lemere y col., 1996).

1. 4. 2. Mutaciones en el gen de las presenilinas 1 y 2

Las presenilinas son proteínas de membrana constituidas por ocho dominios transmembrana, que forman parte del complejo γ -secretasa. Existen dos isoformas de presenilinas denominadas PS1 y PS2 cuyos genes se localizan en el cromosoma 14 y 1, respectivamente. Estudios intensivos han identificado setenta y cinco mutaciones en el gen de la PS1 y tres en el gen de la PS2, que parecen afectar a un centenar de familias en todo el mundo. Los síntomas clínicos preseniles aparecen entre los 40 y 50 años; incluso se han dado casos en los que aparecen antes de los 30 años (Hardy, 1997). La frecuencia de aparición de mutaciones en la PS1 y la PS2 es de un 3% y un 0,5%, respectivamente, del total de casos de aparición precoz de EA.

La presencia de mutaciones en el gen de la PS1 origina las formas más agresivas de EA descritas hasta la actualidad, apareciendo los síntomas antes de los 50 años y causando la muerte a los 60 años. Estas mutaciones causan alteraciones en el procesamiento de la PPA, originando un aumento del A β (1-42), como sugiere la determinación directa de este péptido en plasma y fibroblastos de pacientes portadores de mutaciones así como, los experimentos realizados en cultivos celulares y animales transgénicos que expresan estas mutaciones (Scheuner y col., 1996; Xia y col., 1997). Además, se ha demostrado que dichas mutaciones incrementan entre un 1,5% y un 3% la abundancia relativa de placas seniles formadas por el A β (1-42), en comparación con los niveles observados en casos esporádicos de EA (Mann y col., 1996).



1. 4. 3. Polimorfismo del gen de la apolipoproteína E

Estudios iniciales sobre la genética de la EA, demostraron que en el LCR de individuos con esta enfermedad existía una proteína que inmovilizaba el A β , favoreciendo su agregación. Posteriormente, mediante estudios inmunohistoquímicos, se identificó esta proteína como una lipoproteína transportadora de colesterol denominada ApoE. El gen que codifica para la ApoE está localizado en el cromosoma 19. En su región codificadora, existen dos sitios polimórficos que dan lugar a tres haplotipos, Apo E ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4, que se encuentran con frecuencia en la población general. El análisis genético de individuos con casos esporádicos de EA reveló que el alelo ϵ 4 de este gen estaba sobreexpresado (Strittmatter y col., 1993). Además, la herencia de uno o dos de estos alelos aumenta la probabilidad de desarrollar la forma esporádica de esta enfermedad a partir de los 60-70 años del individuo. Por lo tanto, el gen de la ApoE es el único que se asocia, de manera incuestionable, con la forma esporádica de la EA. En relación con los otros dos haplotipos, hay evidencias que indican que la herencia de ϵ 2 confiere protección contra el desarrollo de la EA (Corder y col., 1994).

1. 5. Alteraciones neuroquímicas

Existe una variedad de sistemas de neurotransmisión que se encuentran alterados en la EA. La mayoría de estos sistemas participan en los procesos de aprendizaje y memoria, así como en el mantenimiento del tono muscular y en procesos conductuales. Por ello, el déficit cognitivo característico de la EA se correlaciona, al menos en parte, con las alteraciones de estos sistemas de neurotransmisión.

1. 5. 1. Neurotransmisores y receptores de neurotransmisores

1. 5. 1. 1. Sistema colinérgico

En 1985, Hardy y col. detectaron por primera vez un déficit de los neurotransmisores acetilcolina y colina así como un aumento en los niveles de la enzima acetilcolinesterasa, en estudios postmortem de cerebros procedentes de individuos con EA. El número de receptores nicotínicos y de receptores muscarínicos tipo II estaban disminuidos en la corteza temporal de enfermos de EA (Mash y col., 1985), sin cambios en los otros cuatro tipos de receptores muscarínicos. No obstante, dichos receptores podrían no ser totalmente funcionales en la EA ya



que se ha observado que están parcialmente desacoplados de las proteínas G (Warpman y col., 1994).

Recientemente, Fodero y col. (2004) han demostrado que el A β (1-42) actúa como un agonista de los receptores $\alpha 7$ nicotínicos, aumentando los niveles de la acetilcolinesterasa, especialmente alrededor del núcleo de las PNS, en cultivos primarios de neuronas corticales de ratón.

1. 5. 1. 2. Sistema adrenérgico

Numerosos grupos de investigación han confirmado la disminución de los niveles de noradrenalina, entre un 30 y un 70%, en el cerebro de pacientes de EA. Asimismo, el número de los receptores α -adrenérgicos en dichos pacientes permanece inalterado en todas las áreas cerebrales salvo en el hipocampo, donde se ha detectado una ligera disminución en el número de los receptores $\alpha 1$ y $\alpha 2$ adrenérgicos (Shimohama y col., 1986, a; Gottfries, 1990). Los receptores β -adrenérgicos tampoco están alterados en la EA salvo en el hipocampo, donde se ha descrito un aumento en el número de los receptores β -adrenérgicos tipo I y una disminución de los receptores β -adrenérgicos de tipo II (Shimohama y col., 1986, b).

1. 5. 1. 3. Otros sistemas de neurotransmisión

En los estadios tempranos de la EA, se produce una disminución de los niveles de dopamina y serotonina de aproximadamente un 50% y un 70%, respectivamente, tanto en la corteza cerebral como en el LCR de pacientes con EA. Este déficit de neurotransmisores hace que el individuo sea más vulnerable a desarrollar una depresión. Asimismo, los niveles proteicos del ácido gamma-amino butírico (GABA) y el número de sus receptores están disminuidos en un 50% en la corteza temporal de enfermos con la EA (Norberg, 1992). Otros neurotransmisores cuyos niveles proteicos están disminuidos en distintas áreas cerebrales en la EA incluyen la somatostatina (SRIF), el neuropéptido Y (NPY) y la neurotensina, siendo la reducción de la SRIF en la corteza cerebral la más significativa (Davies y col., 1980). Además, Beal y col. (1985) observaron que en éste área cerebral, el número de receptores específicos para la SRIF también está disminuido en estos enfermos. No obstante, el número de dichos receptores en el hipocampo de enfermos con EA permanece inalterado en comparación con individuos controles (Slama y col., 1991). Sin embargo, la galanina y el glutamato se encuentran aumentados en la EA (Wallin y col., 1991; D'Aniello y col., 2005). El incremento de la galanina conducirá a una



inhibición del sistema colinérgico, acentuando los cambios producidos en dicho sistema en la EA.

1. 5. 2. Efectores

Los neurotransmisores descritos anteriormente se unen a receptores pertenecientes a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) para desencadenar una determinada respuesta celular. Estos receptores transducen la señal a un efector vía una proteína G. Varios estudios han demostrado que los niveles de estas proteínas G, una familia de proteínas de membrana heterotriméricas que unen nucleótidos de guanina (GDP o GTP), están significativamente alterados en la EA. Así, se ha demostrado que el A β (1-40) activa una proteína de la familia Gi/Go y que la inhibición de dicha actividad atenúa la toxicidad celular inducida por el A β . Además, se ha observado que cuando el A β está agregado formando protofibrillas o fibrillas, se produce un aumento de la actividad GTPasa (Wang y col., 2001, 2003). Rymer y Good (2001) demostraron que el A β aumenta la actividad GTPasa de las subunidades G α o y G α i a través de un efecto que no está mediado por receptor. La actividad de estas dos familias de proteínas G podría explicar algunos resultados previos de diferentes autores que asocian el A β con la modulación de canales de K⁺ y de Ca²⁺ (Chen, 2005; Simakova y Arispe, 2006). Por consiguiente, estos resultados sugieren que la toxicidad del A β está mediada, al menos en parte, por la activación de las proteínas G.

Asimismo, se ha descrito que hay varios efectores alterados en la EA. Estudios postmortem de cerebros procedentes de enfermos con EA han revelado alteraciones en la composición química de los fosfolípidos así como un aumento en los productos de hidrólisis de la enzimas fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa D (PLD) y fosfolipasa A₂ (PLA₂), productos que actúan como segundos mensajeros. Estas enzimas, a su vez, pueden ser activadas por el A β . Por ejemplo, se ha observado que en células de neuroblastoma humano LAN-2, el A β (25-35) estimula las fosfolipasas anteriormente citadas (Singh y col., 1995; Kanfer y col., 1998). También se ha descrito una disminución en la actividad de la PKC y un aumento de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), contribuyendo a los déficit de memoria que acompañan a la EA (Olariu y col., 2002; O'Mahony y col., 1998). En relación con la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC), existe una gran discrepancia sobre su posible alteración en esta enfermedad.



1. 6. Tratamiento y prevención de la Enfermedad de Alzheimer

Ante todo, hay que tener en cuenta que el tratamiento de la EA no es curativo, pero permite mejorar los síntomas durante las fases iniciales de la enfermedad. Se pueden diferenciar tres tipos de estrategias terapéuticas dependiendo de las alteraciones a las que van dirigidas:

- A) Tratamientos encaminados a mejorar las manifestaciones cognitivas y conductuales de la enfermedad. Así, se utiliza el haloperidol, un antagonista de los receptores de dopamina, para el tratamiento de la agresividad y la agitación. Por otro lado, la desipramina, un metabolito de la imipramina que aumenta los niveles de noradrenalina y serotonina se emplea para evitar el desarrollo de una depresión.

- B) Tratamientos específicos para restablecer los niveles de los distintos neurotransmisores que se encuentran alterados. Para mejorar el déficit de acetilcolina, se utilizan inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (tacrina, fisostigmina, donepezil, metrifonato y exolen) con objeto de incrementar la concentración y duración de este neurotransmisor en la sinapsis neuronal. De todos ellos, el más utilizado es el donepezil, puesto que su vida media en plasma es muy larga y además, no produce apenas efectos secundarios. También se administran inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, y derivados de dopamina (Johannsen, 2004).

- C) Tratamientos enfocados a inhibir la producción y agregación del A β , dada la gran importancia de este péptido en la patogénesis de la EA. Para ello, se utilizan inhibidores de las β y γ -secretasas, estimuladores de la α -secretasa, anticuerpos anti-A β capaces de atravesar la barrera hematoencefálica e introducirse en el parénquima cerebral, y pequeñas moléculas capaces de unirse al A β , evitando su agregación. Por otro lado se ha visto que el incremento de la producción del A β en la EA también se debe a una disminución del catabolismo de este péptido mediado por la enzima neprilisina. Por lo tanto, los estudios actuales sugieren posibles estrategias para evitar esta reducción del catabolismo en los estadios tempranos de la enfermedad, e incluso aumentar dicho proceso en aquellos estadios en los que ya se han formado las PNS (Saido y Iwata, 2006).



Las líneas de investigación actuales, están encaminadas a estudiar el efecto neuroprotector de una gran variedad de moléculas y fármacos de distinta naturaleza química, tanto en la EA como en otras enfermedades neurodegenerativas. Así, por ejemplo, se ha observado que la memantina es eficaz en la EA puesto que es capaz de bloquear la hiperactivación de los receptores de NMDA producida por el exceso de glutamato, regulando los canales de Ca^{2+} de la membrana celular (Koch y col., 2005). La terapia mediante estrógenos también reporta efectos beneficios en la EA, aunque su utilización se ve limitada por los efectos adversos (aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades venosas, cáncer de mama y de endometrio) (Wise, 2002). Por otro lado, Cheng y col. (2006) han demostrado que la melatonina es capaz de inhibir la hiperfosforilación de la proteína tau, en un modelo animal de la EA, lo que sugiere que su administración en enfermos con EA podría bloquear la progresión de la demencia típica de esta enfermedad. Actualmente, se ha establecido la existencia de una serie de fármacos que poseen una cierta actividad anti-amiloidegénica, por lo que podrían ejercer un efecto neuroprotector en la EA. Los primeros estudios realizados *in vitro* revelaron que antibióticos como la rifampicina, las tetraciclinas y el miricetin, entre otros, son capaces de impedir la formación de depósitos amiloideos y de disgregar fibrillas preformadas (Forloni y col., 2001; Ono K y col., 2004). Estudios posteriores se han centrado en evaluar este efecto *in vivo*. Así, se ha demostrado que la eritromicina y el tramiprosato (AlzhemedTM) ejercen esta actividad anti-amiloidogénica en modelos experimentales de la EA (Tucker y col., 2005; Gervais y col., 2006).



2. SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO

2. 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 (GH) *in vitro* en cultivos de células adenohipofisarias. A esta sustancia la denominaron inicialmente “factor inhibidor de la secreción de GH”, ya que se planteó que podría ejercer acciones fisiológicas antagónicas al “factor liberador de la GH”, caracterizado por Dhariwall y col. (1965). Cinco años más tarde, Brazeau y col. (1973) aislaron y caracterizaron un tetradecapéptido de hipotálamo ovino que inhibía la secreción de la GH tanto *in vivo* como *in vitro*, el cual denominaron somatostatina (SRIF). Por este descubrimiento se concedió el Premio Nobel de Medicina y Fisiología al profesor Roger Guillemin en 1977. Estudios posteriores revelaron que la SRIF está ampliamente distribuida en el organismo, detectándose a lo largo del SNC y del sistema nervioso periférico (SNP), así como en el tracto gastrointestinal y los islotes de Langerhans. La SRIF es una proteína que se encuentra tanto en el reino animal, en vertebrados e invertebrados como en el reino vegetal. La amplia distribución de esta hormona sugiere que ejerce múltiples funciones en el organismo. Dichas funciones se centran en modular la neurotransmisión, secreción glandular, contractilidad de la musculatura lisa y proliferación celular. Por lo tanto, actúa como un regulador fisiológico de las funciones del sistema gastrointestinal, sistema inmune y sistema nervioso, por lo que habría que considerar la importancia de este péptido en la fisiopatología de varias enfermedades tales como la diabetes mellitus, epilepsia, cáncer, EA y corea de Huntington, entre otras muchas.

2. 2. Estructura de la somatostatina

Actualmente, la SRIF se considera una familia filogenéticamente antigua de péptidos que consta de dos formas biológicamente activas: la SRIF-14, forma molecular que se identificó originalmente en el hipotálamo, y la SRIF-28, que fue aislada y caracterizada posteriormente por Pradayrol y col. (1980). La SRIF-14 es un péptido básico de 1,64 kDa constituido por catorce aminoácidos, que presenta un puente disulfuro entre dos cisteínas situadas en la posición 3 y 14, lo que le confiere a la molécula una estructura cíclica estable. La SRIF-28, de peso molecular 3,5 kDa, contiene la secuencia completa de la SRIF-14 en el extremo C-terminal y catorce aminoácidos más en el extremo N-terminal. Mediante modificaciones en la estructura cíclica, se



ha podido identificar el centro activo de la molécula, que se encuentra situado entre los aminoácidos 7 y 10 (Brown y col., 1977) (Figura 4). Este descubrimiento ha permitido diseñar, por un lado, análogos de SRIF más cortos y menos sensibles a la degradación enzimática, como el SMS 201-995 (octreótido) y el BIM23014 (lanreotido), muy utilizados en clínica para el tratamiento de la acromegalia y de tumores gastrointestinales y, por otro lado, análogos en los que se sustituye una fenilalanina por una tirosina para que la molécula pueda ser yodada y utilizada como trazador.

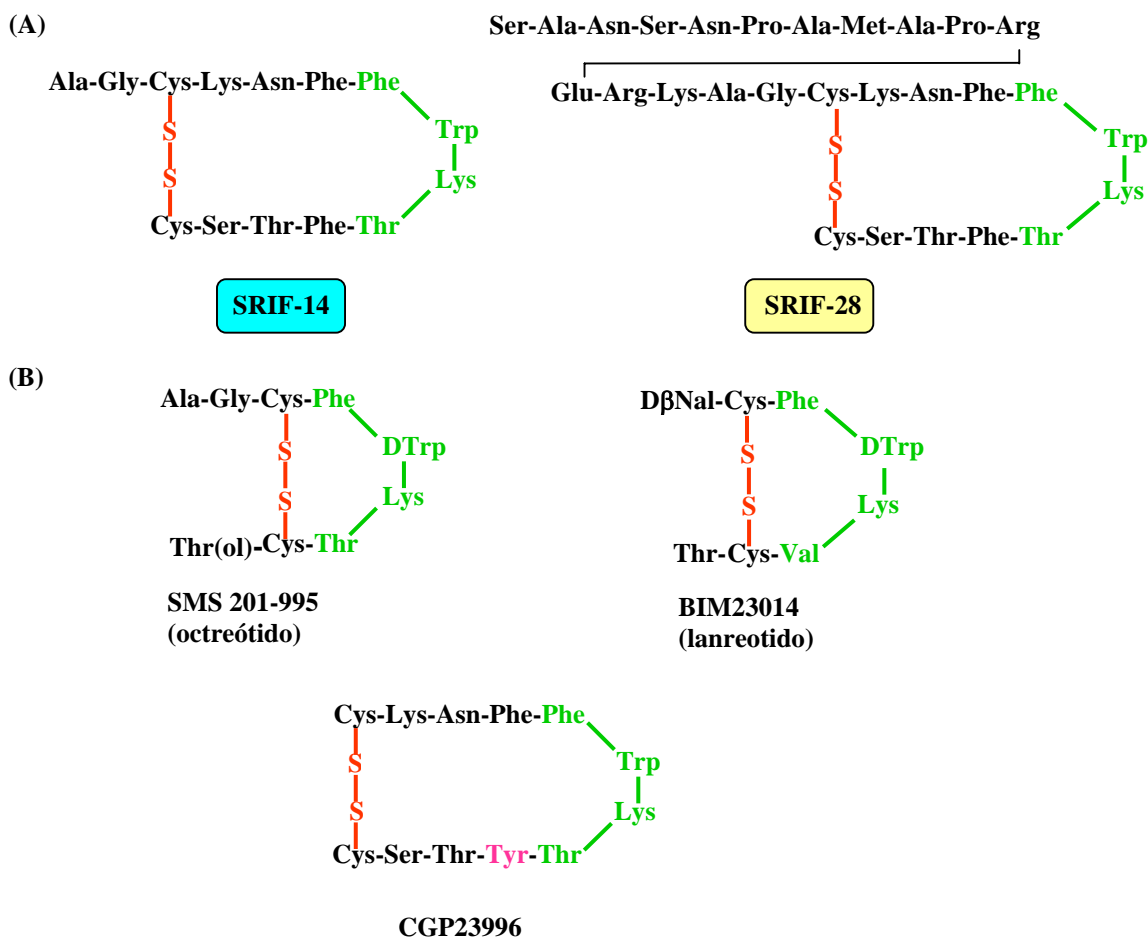


Figura 4. Estructura química de la SRIF-14, la SRIF-28 (A) y de distintos análogos de SRIF (B).

2. 3. Biosíntesis de la somatostatina

La SRIF-14 y la SRIF-28, derivan de una molécula precursora, la prepro-SRIF, que es producto de un único gen en mamíferos. En los peces, sin embargo, ambos productos bioactivos están codificados por dos genes distintos (Patel, 1992). La prepro-SRIF se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso, donde se va a escindir rápidamente, probablemente entre la glicina-24 y



la glicina-25, generando un péptido de 92 aminoácidos y 10 kDa denominado pro-SRIF (Figura 5). Esta molécula es hidrolizada, a su vez por tres dominios distintos, originando varios fragmentos sin actividad biológica tales como la SRIF-28_[1-12], pro-SRIF_[1-76] (8 kDa), pro-SRIF_[1-63] (7 kDa) y pro-SRIF_[1-10] y las dos formas biológicamente activas, SRIF-14 y SRIF-28. La ruptura proteolítica de la pro-SRIF por el dominio dibásico (Arg/Lys) y el dominio monobásico (Arg) del extremo C-terminal generan SRIF-14 y SRIF-28, respectivamente, mientras que la hidrólisis por el dominio monobásico (Lys) del extremo N-terminal da lugar a la pro-SRIF_[1-10] (antrina) (Figura 5). Este procesamiento se realiza en el interior de las vesículas secretoras del aparato de Golgi, donde la hidrólisis se lleva a cabo por endoproteasas convertoras de propéptidos (PC). Hasta el momento, se han identificado ocho tipos distintos de estas enzimas, denominadas PC1-6, furina y PACE-4 (Patel y Galanopoulou, 1995).

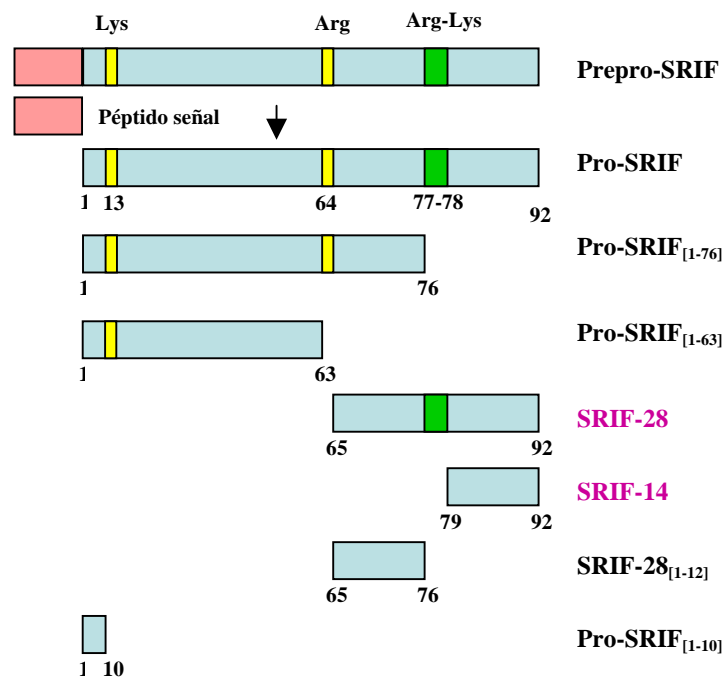


Figura 5. Esquema de los productos generados a partir del procesamiento de la prepro-somatostatina.

La SRIF-14 predomina en el tejido nervioso y es prácticamente la única forma presente en la retina, páncreas, estómago y neuronas entéricas. La SRIF-28 representa alrededor del 20%-30% del total de la somatostatina inmunorreactiva (SRIF-IR) presente en el cerebro, pero no está claro si esta forma coexiste como resultado de la síntesis de la SRIF-14, o si es producida de manera aislada por otras neuronas. En el humano, el mayor grupo de células productoras de SRIF-28 se encuentran en la mucosa intestinal (Patel, 1999).



2. 4. Estructura y regulación del gen de la somatostatina

El gen de la SRIF se secuenció primero en la rata (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, separados por un intrón de 621 pares de bases. En el extremo 5' del gen, entre los promotores caja TATA y CAAT, se localiza una secuencia palindrómica de 8 pares de bases, 5'-TGACGTCA-3', que se denomina elemento de respuesta a AMPc o CRE. Además, este gen está flanqueado en el extremo 5' y 3' por ácido desoxirribonucleico (ADN) z (ADNz) que se cree que son lugares adicionales para la unión de proteínas y para la regulación de la expresión génica (Figura 6).

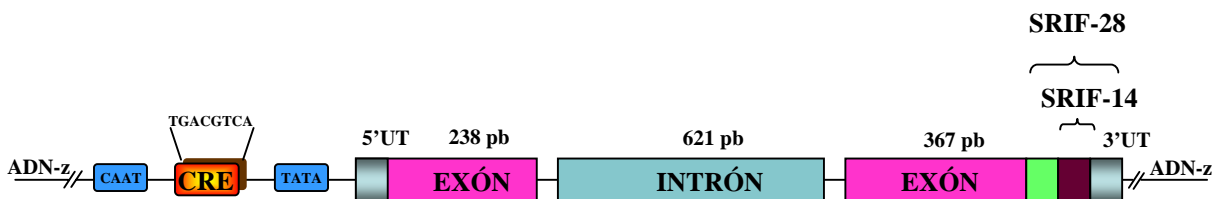


Figura 6. Estructura del gen de la somatostatina en la rata.

La expresión del gen de la SRIF está regulada por una gran variedad de moléculas de diversa naturaleza que se resumen en la [tabla 1](#). No se conoce el mecanismo molecular mediante el cual actúan pero sí que la activación de la transcripción está directamente mediada por el AMPc, vía CRE. Después de la estimulación de la enzima AC, inducida por vía receptor, se produce un aumento en los niveles de AMPc, que activan a la PKA. A continuación, la subunidad catalítica de la PKA es transportada al núcleo celular donde, junto al coactivador CBP (proteína de unión a CREB) (Kowk y col., 1994), de 265 kDa, se fosforila una proteína nuclear de 43 kDa denominada CREB (proteína de unión a CRE). La proteína CREB fosforilada (p-CREB) se une al elemento CRE del gen de la SRIF, estimulando su transcripción (Montminy y col., 1996). Asimismo, los agentes que regulan la transcripción génica pueden ejercer distintos efectos dependiendo del tejido en el que se exprese el gen de la SRIF. Los glucocorticoides, por ejemplo, disminuyen los niveles de ARNm en la corteza cerebral e hipotálamo mientras que en el estómago, páncreas y yeyuno, provocan un aumento de dichos niveles (Papachristou y col., 1994).



Efectos sobre los niveles de ARNm de la SRIF		
↑	↓	↑ o ↓
AMPc Ca ²⁺ GMPc NO Testosterona Estrógenos HG IGF-I e IGF-II IL-1, IL-6 y IL-10 TGF-β	Insulina TGF-β Leptina	Glucocorticoides

↑ Aumenta; ↓ Disminuye

Tabla 1. Regulación de la expresión génica de la somatostatina mediada por distintas moléculas.

2. 5. Distribución de la somatostatina

Después del descubrimiento de la SRIF, numerosos estudios revelaron que este péptido no sólo se encuentra en el hipotálamo sino que está ampliamente distribuido en todo el organismo (Tabla 2). 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. Estas células somatostatinérgicas se localizan principalmente en el SNC, a excepción del cerebelo, en el SNP, páncreas endocrino e intestino y en baja proporción en el tiroides, glándulas adrenales, glándulas submandibulares, riñón, órganos linfáticos, placenta, próstata y testículos. En ambos tipos de células somatostatinérgicas, la liberación de la SRIF es inducida por la despolarización de la membrana. Dicha liberación está modulada por una amplia gama de moléculas tales como iones, nutrientes, neuropéptidos, neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento (Tabla 3). Algunas de estos agentes ejercen efectos comunes sobre las células somatostatinérgicas que están localizadas en distintos órganos. En la rata, el intestino contiene el 65% de la SRIF total del organismo, el cerebro contiene el 25%, el páncreas el 5% y los órganos restantes representan el 5% (Patel, 1992).

2. 5. 1. Distribución en el sistema nervioso central

Todos los estudios realizados en el presente trabajo se han realizado en distintas áreas cerebrales (corteza cerebral e hipocampo) de rata; por ello es de gran interés profundizar en la



distribución de la SRIF y de su ARNm a nivel del SNC. Aunque la SRIF se descubrió por primera vez en el hipotálamo, las mayores concentraciones de SRIF se encuentran en áreas cerebrales fuera del hipotálamo. Así, la habénula, amígdala, septum, hipocampo, sistema límbico y las capas II-III y V-VI de la corteza cerebral contienen grandes cantidades de SRIF mientras que el estriado y la sustancia gris presentan niveles moderados (Schindler y col., 1996).

	Tipo celular	Localización
Principales localizaciones		
Sistema nervioso	Neuronas	Hipotálamo Corteza Hipocampo 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 2. Distribución de la somatostatina en el sistema nervioso central y tejidos periféricos.

Mediante estudios de hibridación *in situ* se ha demostrado que el ARNm de la SRIF está ampliamente distribuido en el sistema SNC, tanto en humanos como en rata (Garret y col., 1994). En la corteza cerebral de la rata, las capas II, III, V y VI son las que presentan una mayor densidad de ARNm mientras que en humanos, existe una distribución muy uniforme en todas ellas. A su vez, tanto en la rata como en humanos, la corteza temporal contiene una gran



población de células somatostatinérgicas (González-Albo y col., 2004). En el hipocampo, todos los subcampos CA contienen el ARNm de la SRIF, sin embargo, en el giro dentado de la rata, solo se encuentra en la capa polimórfica. En el tálamo, la distribución del ARNm es muy dispersa mientras que en el hipotálamo, el ARNm solo se encuentra en el núcleo paraventricular. No se ha descrito la presencia de ARNm de la SRIF en la sustancia negra y cerebelo del cerebro humano. Sin embargo, en la capa granular del cerebelo de la rata, se ha encontrado ARNm en muy baja proporción (Cooper y col., 1981; Johansson y col., 1984). Por último, también se ha detectado ARNm de la SRIF en la médula, núcleo del tracto solitario y núcleos trigeminales espinales, tanto en humanos como en la rata.

Efectos sobre la liberación de SRIF	
Estimulan la secreción	Inhiben la secreción
Glucosa (Páncreas)	Glucosa (Hipotálamo)
VIP (Neocortex y páncreas)	VIP (Hipotálamo)
Insulina (Hipotálamo)	Insulina (Páncreas e intestino)
Glucagón	GABA
Bombesina	Serotonina
Neurotensina	ACTH
Sustancia P	Opiáceos
Hormonas tiroideas	
HG	
IGF-1	

Tabla 3. Regulación de la secreción de somatostatina mediada por distintas moléculas

2. 6. Acciones biológicas de la somatostatina

La SRIF ejerce una gran variedad de funciones dado su amplio espectro de distribución en el organismo.

2. 6. 1. Tejidos periféricos

En el tracto gastrointestinal, este péptido inhibe la secreción de la mayoría de las hormonas intestinales estudiadas hasta la fecha. Además, inhibe la actividad motora, el vaciamiento gástrico e intestinal, así como la absorción intestinal de Ca^{2+} , carbohidratos, aminoácidos y triglicéridos. Por otro lado, inhibe la proliferación celular del epitelio gástrico e intestinal, y de células precursoras de cartílago y hueso (Weiss y col., 1981; Patel y col., 1992).



En el tiroides, la SRIF inhibe la liberación estimulada por TSH (hormona estimuladora de tiroides) de las hormonas T3 y T4 así como la liberación de la calcitonina. A nivel adrenal, este péptido inhibe la secreción de la aldosterona y la secreción de catecolaminas medulares estimulada por acetilcolina. En los riñones, inhibe la liberación de renina y la absorción de agua. En general, la mayoría de las acciones que presenta la SRIF en los tejidos periféricos se pueden agrupar en dos: inhibición de la secreción e inhibición de la proliferación celular.

2. 6. 2. Sistema nervioso central

En el SNC, la SRIF actúa como un neurotransmisor y/o neuromodulador. A nivel cerebral, modula funciones cognitivas, locomotoras, sensoriales y autonómicas así como la conducta. Por ello, el estudio de este neurotransmisor es de gran interés en aquellas enfermedades neurodegenerativas en las que se encuentra alterada alguna función cerebral; como en la EA, corea de Huntington y algunas encefalopatías. Por otro lado, la SRIF es capaz de inhibir la secreción de diversos neurotransmisores y hormonas como la GH, la noradrenalina, la dopamina en el cerebro medio, la histamina, la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y el glutamato. Sin embargo, estimula la liberación de dopamina en el estriado (Hathway y col., 1999) y no ejerce ningún efecto sobre la secreción de prolactina, serotonina, corticotropina (ACTH) o acetilcolina (Epelbaum, 1992; Patel, 1999).

Diversos estudios postulan que la SRIF ejerce un papel neurotrófico en el desarrollo embrionario del SNC (Schwartz y col., 1998). En el hipotálamo embrionario humano se han detectado, altos niveles de SRIF entre la duodécima y decimocuarta semana de gestación. Esta precoz y abundante aparición de SRIF sugiere, por lo tanto, que este neuropéptido debe tener un papel importante en la diferenciación neuronal (Yew y Chan, 1999).

Recientemente, se ha demostrado que la SRIF regula el metabolismo del A β , principal agente patogénico de la EA, en el cerebro, modulando la actividad proteolítica de la neprilisina, una enzima encargada de degradar dicho péptido *in vivo* (Saito y col., 2005). Asimismo, se ha observado que en el hipocampo de ratones *knockout* para la SRIF, la actividad de la neprilisina es significativamente menor que en los ratones salvajes. Además, se ha detectado un aumento del 50% de depósitos del A β en el cerebro de dichos ratones. La SRIF también regula la localización sináptica de la neprilisina, ya que se ha observado que en los ratones *knockout* para la SRIF, la neprilisina se localiza mayoritariamente en el retículo endoplasmático rugoso y en vesículas



secretoras del aparato de Golgi, encontrándose en menor proporción en la membrana plasmática de las terminaciones presinápticas, localización principal de la enzima.

3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA SOMATOSTATINA

La SRIF ejerce sus acciones biológicas, descritas anteriormente, mediante 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 a distintos sistemas efectores como la enzima AC, canales iónicos, fosfotirosina fosfatasas (PTPs), proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la bomba Na^+/H^+ .

3. 1. Receptores de somatostatina

Los receptores de SRIF, designados sst, 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 postulaban la existencia de múltiples sst (Reubi, 1984). Esta aparente heterogeneidad se clarificó mediante técnicas de clonación molecular, permitiendo así demostrar la existencia de cinco subtipos de sst que se designan como sst1-sst5. En un principio, se clonaron los subtipos sst1 y sst2 de ratón, de humano y de rata (Yamada y col., 1992; Kluxen y col., 1992) y, posteriormente el sst3 de ratón y de humano (Yasuda y col., 1992; Yamada 1993), y el sst4 de rata y de humano (O'Carroll y col., 1992). Por último se clonó el subtipo sst5 de rata y de humano (Bruno y col., 1992; Rohrer y col., 1993).

Estructuralmente, los sst pertenecen a la superfamilia de los GPCR. Poseen siete dominios hidrofóbicos α -helicoidales transmembrana, de 20 a 25 aminoácidos de longitud, separados por bucles extra- e intracelulares de residuos hidrofílicos, con una secuencia N-terminal extracelular y una secuencia C-terminal intracelular. El análisis de homología de la secuencia aminoacídica de estos subtipos de sst revela que un 34% de los aminoácidos son invariables. La mayor similitud se encuentra en los dominios transmembrana, mientras que son los extremos N- y C-terminal los que presentan mayores diferencias (Reisine y Bell, 1995). Por ello, el número de aminoácidos que forman los receptores varía mucho según el subtipo de receptor y la especie animal en la que se exprese. En el humano, los sst contienen entre 356 y 391 aminoácidos. Todos los subtipos de sst de humanos y de otras especies poseen una secuencia



muy conservada situada en el séptimo dominio transmembrana (YANSCANPI/VLY). Este dominio está tan conservado que constituye la señal de identidad de los sst. De modo similar a los GPCR, los sst tienen entre uno y cuatro secuencias consenso de glicosilación asociados con asparagina. El subtipo sst5 presenta un lugar adicional de glicosilación en el segundo bucle extracelular y el sst2 puede también glicosilarse en la parte superior del sexto dominio transmembrana (Eppler y col., 1992). Todos los sst presentan entre tres y ocho sitios de reconocimiento para la PKA y la PKC en el dominio citoplasmático carboxilo terminal y a lo largo del segundo y tercero bucle intracelular, lo que indica que el receptor podría ser regulado mediante fosforilaciones en algunos residuos de estos dominios. El subtipo sst3 se caracteriza por poseer una región rica en ácido glutámico en el dominio C-terminal intracelular. Además, todos los sst, excepto sst3 poseen un tercer bucle intracelular entre los segmentos transmembrana quinto y sexto que parece estar implicado en el acoplamiento a las proteínas G, así como un residuo de cisteína en el séptimo dominio transmembrana. A este residuo se puede unir ácido palmítico, creando así un cuarto bucle citoplasmático, posiblemente para anclar esta región a la membrana plasmática. Curiosamente el subtipo sst3, que carece de esta región de palmitoilación, presenta un dominio carboxilo terminal mucho más largo que el resto de los receptores. Los sst también poseen residuos de tirosina, cuya fosforilación regula la internación de los receptores (Figura 7).

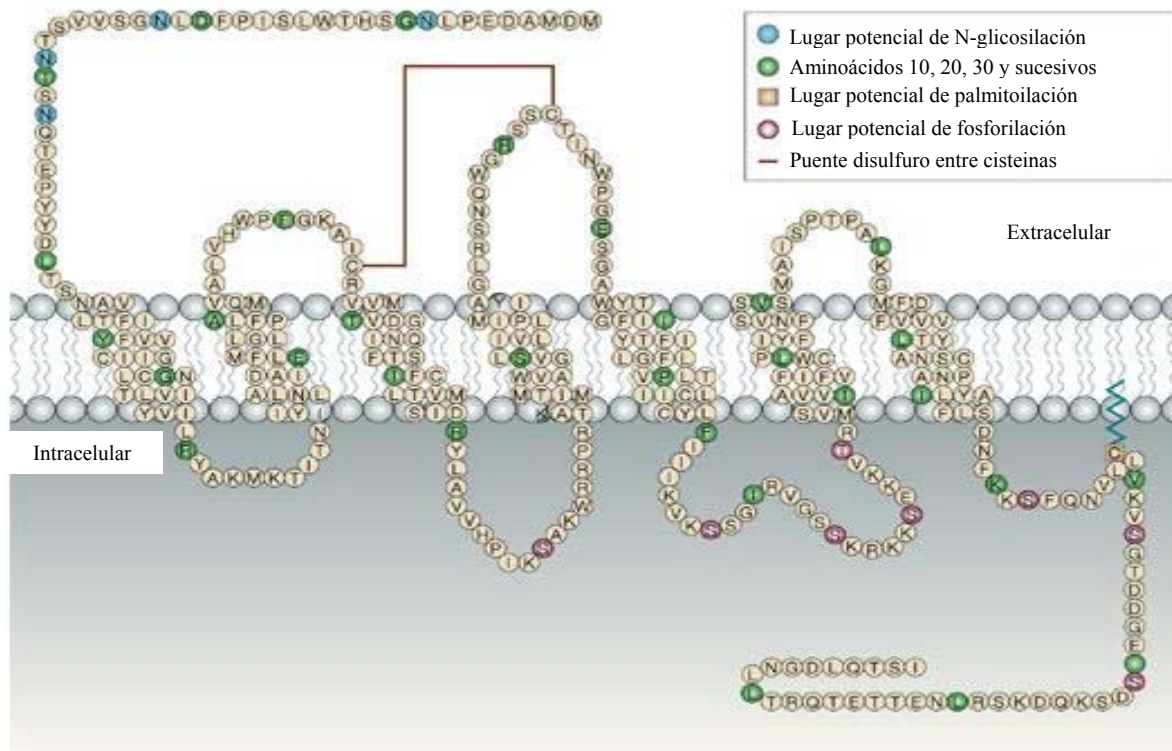


Figura 7. Representación esquemática del receptor de somatostatina sst2 de rata.

3. 2. Estructura de los genes de los receptores de somatostatina

Los genes que codifican los cinco subtipos de receptores de SRIF están localizados en distintos cromosomas. En humanos, los genes de los subtipos sst1, sst2, sst3, sst4 y sst5 se localizan en los cromosomas 14, 17, 22, 20 y 16 respectivamente. Estos genes no presentan intrones entre las regiones codificadoras, excepto el gen del sst2 de ratón que presenta dos intrones, lo que va a dar lugar a la síntesis de dos variantes del receptor, sst2A y sst2B. Sin embargo, se ha observado que la región terminal 5' no traducida (5' UTR) de los genes del sst2 y del sst5 de ratón, así como del sst3 de rata contienen intrones (Baumeister y Meyerhof, 2000). Los principales estudios se han centrado en caracterizar las zonas promotoras de estos cinco genes. Así se ha demostrado que los genes de los subtipos sst1, sst3, sst4 y sst5 poseen un único promotor en la mayoría de las especies. Sin embargo, el gen del sst2 contiene tres zonas promotoras, que en el caso del ratón, están separadas por dos intrones (Figura 8).

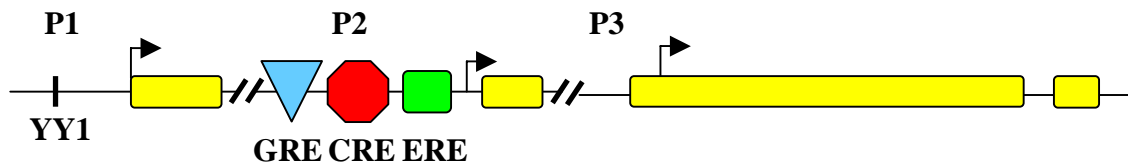


Figura 8. Estructura del gen del subtipo sst2 de ratón. El gen está formado por cuatro exones (cajas amarillas) y dos intrones (líneas oblicuas). Contiene tres promotores (P1-P3) cuyos sitios de iniciación de la transcripción están indicados con flechas. El P1 alberga un sitio de unión para el factor de transcripción Yin Yan 1 (YY1) y el P2 presenta un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), un elemento de respuesta a AMPc (CRE) y un elemento de respuesta a estrógenos (ERE).

La activación del primer promotor solo se ha encontrado en células tumorales hipofisarias AtT-20. El segundo promotor, P2, es activado en aquellos tejidos en los que la SRIF y sus receptores ejercen funciones fisiológicas vitales tales como en el cerebro, hipófisis, glándulas adrenales, páncreas, estómago y testículos. El tercer promotor se encuentra activado en el pulmón, riñón, bazo, útero y ovarios. La caracterización de dichos promotores revela que estas zonas no contienen las clásicas cajas TATA y CAAT, al igual que en la mayoría de los genes de receptores con siete dominios transmembrana. En su lugar, se han encontrado elementos iniciadores en la zona próxima al sitio de iniciación de la transcripción. En la rata, estos elementos están constituidos por sitios de unión con alto contenido en guanina y citosina mientras que en humanos son zonas ricas en timina y citosina. En las zonas promotoras, también existen varias secuencias consenso de distintos elementos de respuesta, que regulan la transcripción de los cinco subtipos de receptores en las distintas especies animales y en distintos tejidos. El elemento de respuesta a hormonas tiroideas (ERT) se encuentra en el promotor de los genes de los subtipos sst1, sst3 y sst5. A su vez, el gen del sst1 y del sst5 posee un elemento de respuesta a progesterona y glucocorticoides. El gen del sst2 y del sst3 contiene un elemento CRE; el gen del sst2 contiene, además, un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) (Kraus y col., 2000). Asimismo, se ha descrito que los cinco subtipos de receptores presentan un elemento de respuesta a estrógenos (ERE), aunque solamente ha sido caracterizado en el gen del sst2 (Kimura y col., 2001).



3. 3. Regulación de los receptores de somatostatina

3. 3. 1. Regulación dependiente de agonista

La administración aguda de SRIF provoca un gran número de efectos inhibidores, mientras que la exposición prolongada al péptido induce una disminución de estas respuestas inhibitoras (Lamberts y col., 1996). Hoy en día, está bien establecido que la fosforilación juega un papel importante en la regulación de los receptores. Se ha demostrado que una vez producida la activación de los receptores por la unión de su agonista, éstos se desensibilizan mediante la fosforilación de residuos de serina y treonina presentes en el dominio C-terminal intracelular del receptor, induciendo el desacoplamiento entre el receptor y las proteínas G. Esta fosforilación se lleva a cabo por miembros de la familia de quinasas de GPCRs (GRKs) (Gainetdinov y col., 2004). Mediante estudios de hibridación *in situ*, se ha demostrado que de las siete isoformas de GRK existentes (GRK1-GRK7), GRK2, GRK3, GRK5 y GRK6 son las que se expresan mayoritariamente en el cerebro de rata (Erdtmann-Vourliotis y col., 2001). Por lo tanto, la fosforilación del receptor y el posterior reclutamiento de proteínas citosólicas denominadas arrestinas (Oakley y col., 2001) producen el desacoplamiento entre el receptor y las proteínas G, y la consiguiente internación y posterior degradación del receptor. Todos los sst, excepto el sst4, se desensibilizan mediante el mecanismo descrito anteriormente. El sst4 posee una alanina en lugar de una treonina en el residuo 331 en el extremo C-terminal. Se ha observado, que el subtipo sst4 de rata transfectado en células de riñón humano, después de su activación por el agonista, posee una cierta resistencia a la desensibilización e internación. En estas mismas células tranfectadas con los subtipos sst1, sst2 y sst3 de rata, se ha descrito que los tres subtipos de receptores se internan rápidamente después de la exposición a SRIF-14 (Kreienkamp y col., 1998). Sin embargo, se ha demostrado que los sst humanos tranfectados en células de ovario de hámster chino (CHO-K1) sufren una rápida internación tras la exposición prolongada a la SRIF, excepto el subtipo sst1 (Hukovic y col., 1999). La máxima internación la sufre el subtipo sst3 (78%) seguido del sst5 (66%), el sst4 (29%) y el sst2 (20%). Existe una cierta discrepancia en el patrón de internación de los receptores, esto se debe, al menos en parte, a las diferencias estructurales entre los subtipos de sst de rata y de humano, así como a la línea celular que se utilice para transfectar los receptores.



3. 3. 2. Regulación de la expresión de los genes de los receptores de somatostatina

La regulación de la expresión de los genes de los sst depende del tiempo y del tejido donde se expresen; además, está influenciada por una variedad de hormonas y estados de enfermedad en los adultos. En la diabetes y en el ayuno, por ejemplo, se observa una disminución en los niveles de ARNm de los subtipos sst1, sst2, sst3 y sst5 en la hipófisis de rata. Cuando estas ratas reciben una inyección de insulina, sólo los niveles de los transcritos del sst5 revierten a los valores control (Bruno y col., 1994). A la vista de estos resultados, se puede especular que el gen del sst5 es activado directamente o indirectamente por la insulina. Además en las células β pancreáticas productoras de insulina, el gen del sst5 presenta altos niveles de expresión. Los niveles de ARNm de los sst se encuentran aumentados en respuesta al tratamiento con AMPc, gastrina, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y SRIF (Patel, 1999).

Por otro lado, los estrógenos, *in vitro*, inducen una regulación a la alta del ARNm del sst2 y del sst3, y una disminución del ARNm del sst1, en células de prolactinoma de rata y en cultivos primarios de hipófisis de rata (Djordjijevic y col., 1998). *In vivo*, se ha demostrado que aunque los estrógenos también inducen un aumento del ARNm de sst2 y sst3, los niveles de ARNm del sst1 están aumentados mientras que los del sst5 están regulados a la baja en la hipófisis de la rata (Kimura y col., 1998). En resumen, los estrógenos ejercen un efecto positivo sobre la expresión de los subtipos sst2 y sst3 y un efecto variable o mínimo sobre los otros tres subtipos de receptores.

La regulación génica de los sst por glucocorticoides es dependiente del tiempo. Así, una exposición a glucocorticoides durante un corto período de tiempo induce un aumento del ARNm del sst1 y del sst2, mientras que un tratamiento prolongado inhibe la transcripción de ambos genes (Xu y col., 1995).

Las hormonas tiroideas también parecen estar implicadas en la regulación de la transcripción. Se ha observado 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 sst1 y del sst5, aunque a niveles muy bajos, mientras que los otros genes de los sst permanecen indetectables (James y col., 1997).



3. 4. Distribución de los receptores de somatostatina

Mediante estudios autorradiográficos, se ha demostrado que los sst están ampliamente distribuidos en el cerebro, hipófisis, glándulas adrenales, páncreas y tracto gastrointestinal. Dado que el presente trabajo se ha realizado en distintas áreas del SNC de rata, la distribución de los sst se centrará en las áreas cerebrales objeto de estudio, aunque se hará un ligero repaso a la distribución de dichos receptores en los tejidos periféricos.

Para analizar la distribución de los cinco subtipos de receptores, tanto en el SNC como en los tejidos periféricos, se han utilizado técnicas de Northern blot, transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), hibridación *in situ* e inmunocitoquímica.

3. 4. 1. Sistema nervioso central

En el cerebro de la rata, se han registrado altos niveles del sst1 en el hipocampo, hipotálamo, hipófisis, corteza cerebral, amígdala y médula espinal mientras que en el cerebelo, hipófisis y estriado, se encuentran bajos niveles del receptor. Asimismo, Pérez y col. (1994) analizaron la distribución del ARNm del sst1 en el cerebro de la rata, detectando su presencia en las capas V-VI de la corteza cerebral, así como en la corteza entorrinal, capa granular y giro dentado del hipocampo. Los estudios inmunocitoquímicos han revelado que el subtipo sst1 es el menos abundante de los cinco subtipos de receptores, tanto en el SNC como en los tejidos periféricos. El subtipo sst2 es el receptor que se expresa mayoritariamente en el cerebro de la rata, representando el 80% del total de los sst. Los estudios de hibridación *in situ* han mostrado una amplia distribución del sst2 a lo largo de todo el SNC, detectándose altos niveles de ARNm del sst2 en la corteza cerebral, especialmente en las capas V y VI, hipocampo, hipotálamo, hipófisis y médula espinal, y bajos niveles en estriado y en cerebelo (Pérez y col., 1994). Bruno y col. (1993) encontraron altos niveles del subtipo sst3 en el cerebelo, hipocampo, corteza cerebral, cerebro medio, hipotálamo, hipófisis y médula espinal a nivel de las láminas I, III y X de la zona lumbar en las neuronas motoras (Segond y col., 1999). Aunque los mayores niveles de ARNm del sst3 se detectan en el cerebelo, sobre todo en la capa granular (Kong y col., 1994), y su distribución es homogénea en el resto del SNC. El subtipo sst4 se expresa en la mayoría de las regiones del SNC, excepto en el cerebelo (Bruno y col., 1992). Estas regiones cerebrales incluyen la corteza cerebral, especialmente las capas IV y VI, hipocampo, en los subcampos CA1 y CA2, hipotálamo, estriado y en la amígdala. Por último en la rata, el subtipo sst5 se



encuentra principalmente en el cerebelo e hipotálamo; en otras áreas cerebrales los niveles de ARNm son muy bajos o prácticamente indetectables (Baumeister y col., 1998).

3. 4. 2. Tejidos periféricos

Se ha observado que la hipófisis y el bazo expresan los cinco subtipos de sst, con un patrón de expresión distinto. En la hipófisis el patrón de distribución es: $sst2 > sst1 = sst3 > sst4 > sst5$ mientras que en el bazo dicho patrón es: $de sst3 > sst1 = sst4 = sst5 > sst2$. El estómago expresa todos los subtipos a excepción del sst2 y del sst4. El intestino delgado contiene ARNm de los subtipos sst1, sst3 y sst5. El principal subtipo expresado en el corazón es el sst3, aunque también se han detectado niveles moderados del sst1 y del sst5. El riñón expresa los subtipos sst2 y sst3 mientras que el hígado expresa sólo el sst3, el páncreas sólo el sst2 y el pulmón exclusivamente el sst4 (Bruno y col., 1993).

4. SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES ACOPLADOS A LOS RECEPTORES DE SOMATOSTATINA

4. 1. Proteínas G

El principal papel de las proteínas G es acoplar los sst a los múltiples efectores regulados por la SRIF. Estas proteínas G, que están adosadas a la superficie interna de la membrana plasmática, son heterotrímeros constituidos por una subunidad α , una subunidad β y una subunidad γ , codificadas por distintos genes (Ross, 1989). En condiciones basales, el guanosín 5'-difosfato (GDP) está unido a la subunidad α . La unión del agonista al receptor conduce a la activación de la proteína G, produciendo un intercambio de GDP por guanosín 5'-trifosfato (GTP) en la subunidad α , que se disociará del complejo β/γ . Tal disociación deja libre la subunidad α para interactuar con los distintos efectores celulares. La subunidad α define a la proteína G e interactúa tanto con el receptor como con el efector a través de su región C-terminal (Birnbaumer y col., 1990). En base a la homología de la secuencia primaria de la subunidad α , se han clasificado las proteínas G en cuatro familias principales denominadas G_s , G_i/G_o , G_q y G_{12} (Simón y col., 1991).

Se ha demostrado que las proteínas $G_{i\alpha 1}$, $G_{i\alpha 2}$, $G_{i\alpha 3}$, $G_{o\alpha 1}$ y $G_{o\alpha 2}$ son sensibles a la toxina pertús (PTX), que bloquea la mayoría de las acciones de la SRIF. Por lo tanto, esto sugiere que las proteínas de la clase $G_{i\alpha}$ y/o $G_{o\alpha}$ realizan un papel específico en la modulación



de las acciones de la SRIF en la célula. Law y col. (1991) fueron los primeros en demostrar que los sst se acoplan específicamente a las subunidades $G_{i\alpha}$ y $G_{o\alpha}$, acoplándose a $G_{i\alpha 1}$ y $G_{i\alpha 3}$, pero no a $G_{i\alpha 2}$, en el cerebro de la rata, y a $G_{o\alpha}$ en células AtT-20. Posteriormente, este mismo grupo de investigación describió que en el cerebro de la rata, $G_{i\alpha 2}$ y $G_{o\alpha}$ solo son capaces de acoplarse a los receptores y formar un complejo, en presencia del agonista (Law y Reisine, 1992). Por consiguiente, en el cerebro, después de la unión de la SRIF a sus receptores, estos son capaces de acoplarse a todos los subtipos de proteínas $G_{i\alpha}$ y $G_{o\alpha}$.

Los subtipos sst2, sst3 y sst4 se acoplan eficientemente a las proteínas G sensibles a PTX. En particular se ha demostrado que sst2 interacciona selectivamente con $G_{i\alpha 1}$, $G_{i\alpha 2}$, $G_{i\alpha 3}$ y $G_{o\alpha 2}$, mientras que el sst3 interacciona con las proteínas $G_{i\alpha 1}$ y $G_{i\alpha 3}$ (Yamada y col., 1992). Por ello, un subtipo de receptor es capaz de acoplarse a distintos sistemas efectores mediante su interacción con distintas proteínas G (Tabla 4).

Subtipo de receptor	Proteína G	Efectores estimulados	Efectores inhibidos
sst1	$G_{i\alpha 3}$	PTP MAPK	AC Canales de K^+ Bomba Na^+/H^+
sst2	$G_{i\alpha 1}$ $G_{i\alpha 2}$ $G_{i\alpha 3}$ $G_{o\alpha 2}$ Gq	Canales de K^+ PTP PLC	AC Canales de Ca^{2+} MAPK
sst3	$G_{i\alpha 1}$ $G_{i\alpha 3}$ Gq	Canales de K^+ PTP PLC	AC MAPK
sst4	Se desconoce el subtipo	Canales de K^+ Bomba Na^+/H^+ PTP	AC MAPK
sst5	Gq	Canales de K^+ PTP PLC	AC Canales de Ca^{2+} MAPK

Tabla 4. Sistemas de transducción de señales acoplados a los receptores de somatostatina. AC: adenilato ciclasa; PTP: fosfotirosina fosfatasa; MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos; PLC: fosfolipasa C.



Con respecto a los subtipos sst1 y sst5 existe una cierta discrepancia en si están acoplados, o no, a proteínas G. Por un lado, Rens-Domiano y col. (1992) observaron que estos subtipos no se acoplan a proteínas G cuando se expresan en células CHO, sin embargo posteriormente otros investigadores han demostrado que tanto el sst1 como el sst5 se acoplan a proteínas G sensibles a PTX en otras líneas celulares. En base a ello, se ha descrito que el subtipo sst1 es capaz de acoplarse a $G_{i\alpha 3}$ (Kubota y col., 1994).

4. 2. Efectores

La amplia variedad de acciones que presenta la SRIF, tanto a nivel del SNC como periférico, 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 SRIF 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, mediado por el acoplamiento de los receptores de SRIF a vesículas de secreción.

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

- Inhibición de la bomba Na^+/H^+
- Estimulación de una PTP de membrana

Para que se lleven a cabo todos estos efectos, se requiere que la SRIF se una a su receptor, que se acopla con algún subtipo de proteína G.

4. 2. 1. Adenilato ciclasa

La AC es una enzima de la membrana plasmática que convierte el nucleótido adenosín 5'- trifosfato (ATP) en AMPc, un segundo mensajero que regula un amplio rango de funciones biológicas en la célula. La actividad de esta enzima está controlada por receptores estimuladores e inhibidores, a través de proteínas Gs y Gi, respectivamente. Hasta la fecha, se han descrito diez isoformas de AC diferentes, designadas AC1-AC9, y una soluble (SAC). Todas ellas, excepto la SAC, serán activadas o inhibidas por una proteínas G. La SAC, sin embargo, se encuentra en el



citoplasma y se activa por bicarbonato. La localización tisular y funciones reguladas por las distintas isoformas de AC se resumen en la [tabla 5](#) (Sunahara y Taussig, 2002).

Isoformas de AC	Distribución	Regulación por proteínas G	Función
AC1	↑ Cerebro y glándula adrenal	Estimulada por G α s Inhibida por G $\beta\gamma$ Inhibida por G α o	Aprendizaje, memoria y plasticidad sináptica
AC2	Cerebro, músculo esquelético, corazón y pulmón	Estimulada por G α s Estimulada por G $\beta\gamma$	-
AC3	Cerebro y epitelio olfatorio	Estimulada por G α s	Olfativa
AC4	Cerebro, corazón, riñón, pulmón, hígado y útero.	Estimulada por G α s Estimulada por G $\beta\gamma$	-
AC5	Cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, útero y glándula adrenal.	Estimulada por G α s Inhibida por G $\beta\gamma$ Inhibida por G α i	-
AC6	Ubícuca	Estimulada por G α s Inhibida por G $\beta\gamma$ Inhibida por G α i	-
AC7	Ubícuca	Estimulada por G α s Estimulada por G $\beta\gamma$	Acción de determinadas drogas
AC8	↑ Cerebro y pulmón,	Estimulada por G α s	Aprendizaje, memoria y plasticidad sináptica
AC9	Cerebro y músculo esquelético	Estimulado por G α s	-
SAC	Testículos	No regulada por proteínas G	Capacitación del espermatozoide

↑ : niveles altos

Tabla 5. Propiedades de las distintas isoformas de la enzima adenilato ciclasa (AC) en mamíferos

Las nueve isoformas de AC (AC1-AC9) poseen una estructura similar, que consiste en dos grupos de seis dominios transmembrana hidrofóbicos separados por un gran lazo citoplasmático y una cola intracelular C-terminal de tamaño similar. El núcleo catalítico de la enzima está formado por las regiones citosólicas. Asimismo, todas las isoformas, excepto la AC9, son estimuladas por forskolina (FK), un diterpeno, que proviene de la planta *Coleus forskohlii* (Premont y col., 1996).

A principios de los años 1980, se observó que la SRIF inhibía la formación de AMPc en el cerebro, hipófisis, páncreas y en células entéricas (Van Calcar y col., 1980). La unión de la



SRIF a sus receptores induce la inhibición de la actividad AC y, por consiguiente, conduce a una reducción en los niveles intracelulares de AMPc. Como consecuencia de la reducción de este segundo mensajero, se produce una disminución de la activación de la PKA, acentuando así el efecto antisecretor de la SRIF (Epelbaum, 1992). En todos los casos estudiados se ha demostrado que el efecto de la SRIF sobre la actividad de la AC está mediado por una proteína Gi sensible a PTX.

Las primeras investigaciones encaminadas a determinar que subtipo de sst implicado en la inhibición de la AC revelaron que la activación por SRIF de los subtipos sst2, sst3 y sst4 inhibe la formación de AMPc, principalmente a través de $G_{i\alpha 1}$ (Yasuda y col., 1992; Rens-Domiano y col., 1992). Los resultados de los estudios sobre el sst1 y el sst5 eran algo confusos. Sin embargo, está bien establecido que todos los subtipos de sst se acoplan negativamente a la enzima AC, a través de distintas subunidades de proteínas Gi (Patel, 1999).

4. 2. 2. Canales de potasio

Los canales de K^+ se acoplan a los sst a través de una proteína G denominada inicialmente G_K cuya caracterización posterior reveló que se trataba de una proteína $G_{i\alpha 3}$ (Yatani y col., 1990). Estudios posteriores realizados por Kozasa y col., (1996) demostraron que en la línea celular de hipófisis AtT-20, la SRIF era capaz de estimular los canales de K^+ mediante la proteína $G_{i\alpha 2}$. Por ello, hasta la fecha, se cree que tanto $G_{i\alpha 3}$ como $G_{i\alpha 2}$ pueden estar implicadas en la activación de estos canales inducida por SRIF. La activación de los sst conduce a la apertura de los canales de K^+ , induciendo la salida de iones K^+ desde el interior celular hasta el exterior. Este tráfico de iones provoca la hiperpolarización de la membrana plasmática y una reducción secundaria de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , ya que la inhibición de la despolarización normal impide la entrada de iones Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. A su vez, esta disminución de los niveles intracelulares de Ca^{2+} produce la inactivación de la PKC, lo que conduce a la inhibición de los procesos secretores. La acción hiperpolarizante de la SRIF, estudiada en neuronas del subcampo CA1 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), que se bloquean por agonistas muscarínicos (Moore y col., 1988; Jacquin y col., 1988). Asimismo, se ha sugerido que existe una vía alternativa a través de la cual la SRIF activa los canales de K^+ de manera indirecta. Esta activación indirecta está mediada por la PLA_2 que es una enzima activada por la SRIF a través de una proteína Gi, lo que



provoca la producción de ácido araquidónico y leucotrienos. Se ha observado que ambos metabolitos estimulan los canales de K^+ en neuronas hipocampales y en células de hipófisis de rata (Schweitzer y col., 1990; Alderton y col., 2001).

Varios estudios se han centrado en analizar el subtipo de sst que se acopla a los canales de K^+ . En primera instancia, se postuló que dado que la proteína $Gi\alpha 3$ era la encargada de activar el canal de K^+ y que los subtipos sst2 y sst3 se acoplan a esta subunidad, teóricamente éstos serían los receptores que estimulaban dichos canales (Yatani y col., 1990). Sin embargo, recientemente se ha observado que los subtipos sst2-sst5 de rata expresados en ovocitos de *Xenopus* son capaces de activar canales de K^+ . Por el contrario, el sst1 media la inhibición de dichos canales. Por consiguiente, se sugiere que todos los sst, a excepción del sst1, podrían estar acoplados a los canales de K^+ activándolos (Kreienkamp y col., 1997).

4. 2. 3. Canales de calcio

Además del efecto indirecto de la SRIF sobre la entrada de Ca^{2+} descrito anteriormente, diversos estudios sugieren que el receptor de SRIF puede inhibir directamente la entrada de este ión vía canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Reisine (1995) demostró que la SRIF, actuando a través de sus receptores, bloquea la entrada de Ca^{2+} estimulada por un agonista de canales de Ca^{2+} , el Bay K8644, en células AtT-20. Este efecto está mediado por una proteína G sensible a PTX pero por antagonistas de los canales de K^+ . Todo ello sugiere que los sst se acoplan directamente a los canales de Ca^{2+} en esta línea celular hipofisaria.

Los estudios electroforéticos de Kleuss y col. (1991) revelaron que la proteína $Go\alpha 2$ acopla selectivamente los sst a los canales de Ca^{2+} . Se postula que el subtipo de sst que está acoplado a este canal es principalmente el sst2, puesto que se ha demostrado que agonistas específicos del sst2, por ejemplo el MK 678 y el Bay K8644, inhiben la entrada de Ca^{2+} tanto en cultivos de células embrionarias como en la línea celular de hipófisis AtT-20. Además, según los estudios de Law y Reisine, (1992) el sst2 interacciona selectivamente con $Go\alpha 2$, lo que apoyaría esta hipótesis. También se ha observado que agonistas selectivos para el sst5 inhiben los canales de Ca^{2+} en las células AtT-20, sugiriendo por tanto que este receptor podría estar acoplado a dichos canales (Tallent y col., 1996).

La inhibición de los canales de Ca^{2+} inducida por la unión de la SRIF a sus receptores no sólo se produce de forma directa. Se ha demostrado que la PKA es capaz de fosforilar estos canales de Ca^{2+} , activándolos. Dado que la SRIF provoca una disminución en los niveles



intracelulares de AMPc, mediante la inhibición de la enzima AC lo que conduce a una menor activación de la PKA y el resultado final la inhibición de los canales de Ca^{2+} . En conclusión, la SRIF también puede ejercer su efecto inhibitor sobre los canales de Ca^{2+} de manera indirecta, es decir a través del AMPc (Tsien y col., 1986).

4. 2. 4. Vesículas de secreción

Se ha observado que la SRIF bloquea la secreción de hormonas estimulada directamente por varios segundos mensajeros, como el AMPc, el inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) o el diacilglicerol (DAG), o por la elevación de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Estos hallazgos indican que la SRIF, independientemente de su efecto sobre el AMPc, el 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 SRIF inhibe la exocitosis es dependiente de GTP y sensible a PTX, lo que sugiere la existencia de una proteína G, denominada G_e junto al lugar donde se produce la exocitosis, acoplada a los sst (Luini y De Matteis, 1990). Recientemente, se ha observado que esta inhibición de la exocitosis vía G_e y dependiente de SRIF, se produce por la activación de una proteína fosfatasa dependiente de Ca^{2+} , denominada calcineurina (Gromada y col., 2001). Hasta hace poco, se desconocía que subtipo de sst estaba implicado en la activación de la calcineurina y posterior inhibición de la secreción exocitótica. Se ha demostrado, sin embargo, que el subtipo sst2 podría mediar dicha inhibición (Strowski y col., 2000; Kramer y col., 2005) (Figura 9).

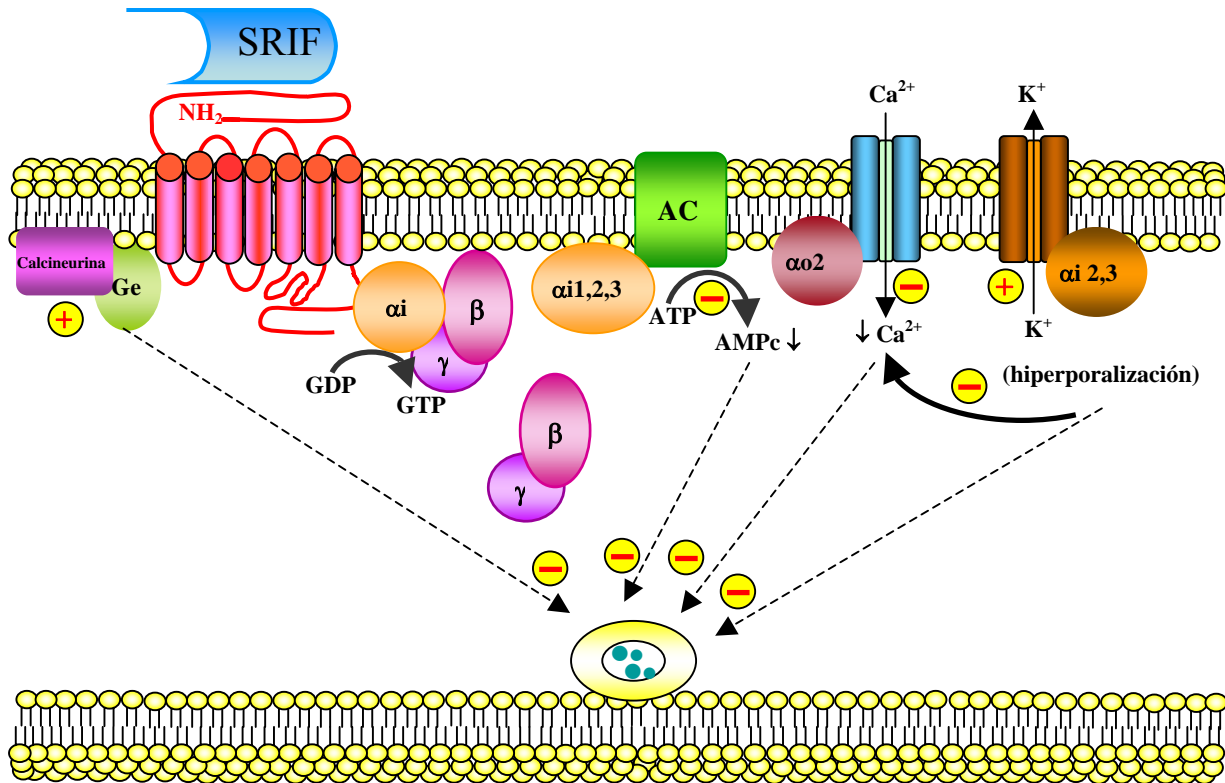


Figura 9. Sistemas de transducción de señales acoplados a los efectores antisecretores de la SRIF.

4. 2. 5. Bomba Na⁺/H⁺

Se ha demostrado que la SRIF, a través del sst1, es capaz de inhibir la bomba Na⁺/H⁺, en células entéricas endocrinas caninas, produciendo una acidificación del medio intracelular (Baber y col., 1989; Hou y col., 1994). Este efecto es independiente de proteínas G sensibles a PTX y conduce a la inhibición de serina/treonina quinasas, con la consiguiente defosforilación e inactivación de los sustratos de dichas enzimas, que están implicados en acontecimientos mitogénicos tempranos. Parece ser que el subtipo sst2 no está acoplado a la bomba Na⁺/H⁺. Sin embargo, los resultados obtenidos por Smalley y col. (1998) sugieren que el subtipo sst4 podría mediar la estimulación de la bomba Na⁺/H⁺ a través de una proteína Gi/Go en células CHO.

4. 2. 6. Fosfotirosina fosfatasa

Las PTPs provocan la defosforilación e inactivación de tirosina quinasas, enzimas que modulan la cascada de las MAPK. Hierowski y col. (1985) describieron por primera vez que la SRIF era capaz de activar las PTPs. Se ha demostrado que los sst estimulan la actividad PTP en todas las líneas celulares tranfectadas con dichos receptores, como por ejemplo en CHO y en



células COS-7 derivadas de riñón de mono. Asimismo, la activación de las PTPs inducida por SRIF es sensible a PTX y a ortovanadato, lo que sugiere que está mediada por proteínas G (Pan y col., 1992). La actividad PTP se atribuye al dominio de homología *src* (SH₂) presente en las PTPs citosólicas cuyos miembros son SHP-1 (SHPTP-1, *syp*, PTP-1D) y SHP-2 (SHPTP-2, PTP-1C). Una vez estimulada la PTP, se produce una translocación de la enzima del citosol a la membrana plasmática (Sharma y col., 1999). Aunque todos los sst se pueden acoplar a la SHP-1, numerosos estudios apoyan la hipótesis de que el subtipo sst2 es el más importante en este aspecto. Así la SPH-1, de 66 kDa, se ha copurificado con los sst en células pancreáticas AR42J, en las que predomina el subtipo sst2 (Zeggari y col., 1994; Ferjoux y col., 2003). Estudios de coimmunoprecipitación en células CHO-K1, que coexpresan el sst2 y SPH-1, han demostrado que la proteína G implicada probablemente sea la G α_3 , ya que ésta inmunoprecipita en presencia de anti-sst2 y anti-SHP-1 (Lopez y col., 1997). Por todo ello, se ha postulado que SHP-1 es la PTP implicada en la inhibición del crecimiento celular mediada por el sst2. Por otro lado, se ha descrito que SHP-2 se acopla a los subtipos sst2, sst3 y sst4 en membranas de células NIH3T3 (Reardon y col., 1997). Estudios realizados en CHO-K1 por Florio y col. (1999), afirman que la estimulación del sst1 también activa a la SHP-2.

La cascada de las MAPK es otra vía que está modulada por la SRIF, a través de las PTPs (Csaba y Dournaud, 2001). Existe cierta controversia acerca de si la activación de los sst induce inhibición o activación de las MAPK. Así, en las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, que expresan el sst2, se ha demostrado que la SRIF inhibe la actividad de las MAPK y, por tanto, la proliferación celular. El ortovanadato bloquea este efecto, lo que apoya la hipótesis de que la inactivación de las MAPK por parte de la SRIF está mediada por PTPs. En células NIH3T3, el sst3 también inhibe la actividad MAPK vía PTPs, ya que estas desfosforilan a Raf-1, con la consiguiente disminución en la actividad de las MAPK. Sin embargo, se ha demostrado que el sst5 inhibe la actividad MAPK a través de la inhibición de la guanilato ciclasa, y por lo tanto, independientemente de PTP (Cordelier y col., 1997). Por otro lado, se ha descrito que la activación de las MAPK, vía sst también es capaz de inhibir la proliferación celular. Así, en células CHO-K1, la activación del sst1 estimula las MAPK, dando lugar a la inhibición de la proliferación celular. Se atribuye este efecto a la activación del sst1, que daría lugar a la activación de una quinasa regulada por la señal extracelular (ERK), con participación de Ras, fosfoinositido 3-quinasa (PI3-K), Raf-1 y SHP2, lo que incrementaría a su vez, la expresión de

un inhibidor del ciclo celular llamado p21^{cip1}/WAF1, que sería el responsable de inhibir la proliferación celular (Florio y col., 1999) (Figura 10).

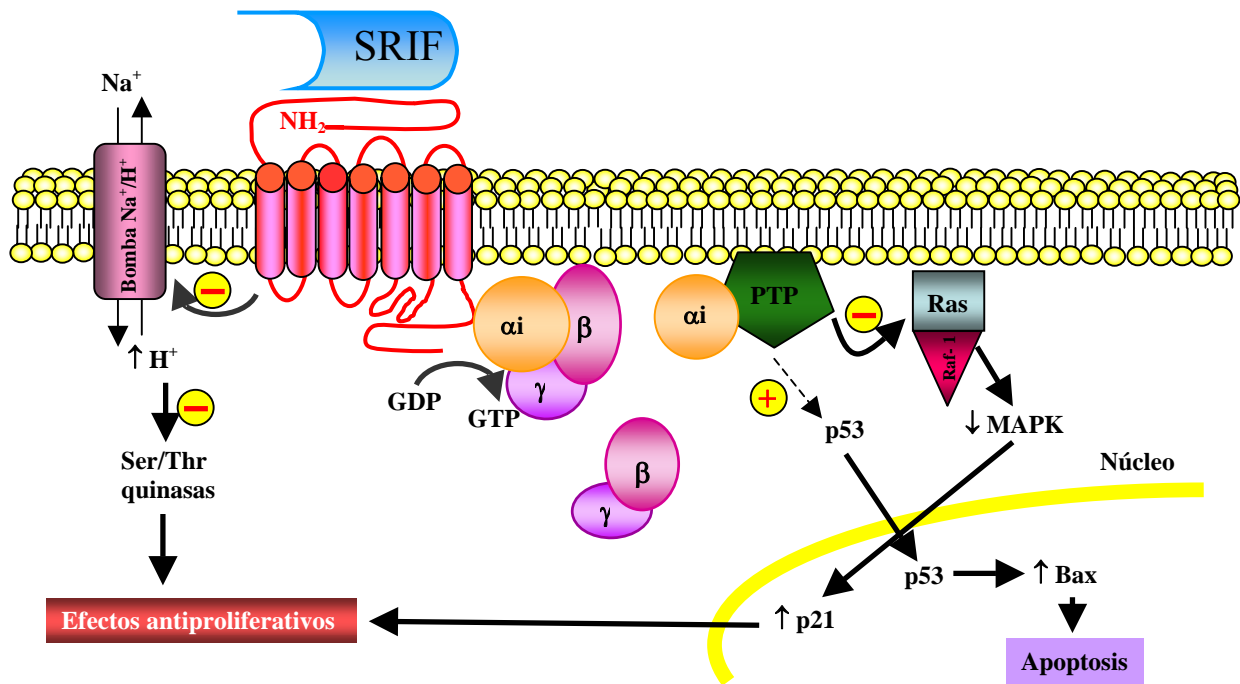


Figura 10. Sistemas de transducción de señales acoplados a los efectos antiproliferativos de la SRIF.

Por consiguiente podemos deducir, que en base a todos estos hallazgos, según el subtipo de sst que se estimule y el tipo celular, puede producirse tanto activación como inhibición de la actividad MAPK induciendo, en cualquier caso, una inhibición de la proliferación celular dependiente de PTPs (Tabla 4).

Aparte de este efecto citostático de la SRIF, Thangaraju y col. (1999) han sugerido que la SRIF también induce apoptosis. Esta señal citotóxica, mediada por la activación de los sst, es traducida por SHP-1, cuya activación estará regulada por el pH intracelular (pH 6.5). Esta PTP se encargaría de la activación de p53 y Bax, proteínas que, a niveles elevados, inducen apoptosis.

4. 2. 7. Fosfolipasa C

La PLC es otro efector acoplado a los sst. Hasta el momento, se han identificado diez isoformas de PLC (Rhee y Choi, 1992). Esta enzima juega un importante papel en la mediación de las acciones celulares de muchas hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento. La activación de la PLC produce la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) y la generación de los segundos mensajeros IP₃ y DAG. El acoplamiento del receptor con la PLC se



produce a través de una proteína G no sensible a PTX de la clase Gq. El IP_3 se une a sus receptores intracelulares específicos, situados en depósitos de Ca^{2+} intracelulares no mitocondriales, produciendo la liberación de Ca^{2+} . EL DAG junto con el Ca^{2+} es el activador endógeno de la PKC (Berridge, 1993).

La mayoría de los investigadores han encontrado que en el cerebro, la SRIF induce un aumento de los niveles de IP_3 mientras que en otros tejidos, se ha encontrado el efecto contrario como por ejemplo en los islotes pancreáticos (Malm y col., 1991). Lachowicz y col. (1994) y Muñoz-Acedo y col. (1995) han demostrado que la SRIF aumenta la concentración de IP_3 en homogenados de hipófisis, hipocampo y corteza. También se ha observado que la SRIF provoca la movilización de Ca^{2+} en células que expresan sst nativos, como son cultivos de astrocitos procedentes de estriado (Delemeau y col., 1992). Por otra parte, todos los sst humanos transfectados en células COS-7, median la activación de la PLC a través de mecanismos sensibles a PTX cuando son estimulados con bajas concentraciones de SRIF (Tomura y col., 1994). A altas dosis de SRIF, los subtipos sst2, sst3 y sst5 son capaces de estimular la PLC, pero a través de vías insensibles a PTX. Esto significa que los cinco sst se acoplan preferentemente a proteínas Gi/Go a bajas concentraciones de SRIF, pero los subtipos sst2, sst3 y sst5 pueden acoplarse a la proteína Gq para activar la PLC a altas dosis del péptido. En células CHO transfectadas con el sst1, la SRIF estimula la formación de IP_3 , siendo este efecto bloqueado por PTX (Kubota y col., 1994).

Ya que la SRIF ejerce efectos tanto excitadores como inhibidores sobre las neuronas, la activación de la PLC puede relacionarse con la excitación de neuronas del SNC sensibles a SRIF. Esto sugiere que la formación de IP_3 está implicada en el mecanismo de acción de la SRIF en el cerebro.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

La EA es un trastorno neurodegenerativo irreversible del SNC que se caracteriza clínicamente por alteraciones cognitivas y conductuales. A nivel estructural, uno de los rasgos más características es la presencia de PNS formadas principalmente por el A β . Actualmente, numerosos autores han sugerido que el A β es el principal agente patogénico de dicha enfermedad. Las alteraciones neuroquímicas descritas en la EA se correlacionan, en parte, con algunos de los déficits cognitivos. Entre los distintos neurotransmisores alterados, cabe destacar la reducción de los niveles de acetilcolina y de la SRIF. La SRIF es un tetradecapéptido ampliamente distribuido en el SNC que está implicado en la regulación de procesos de aprendizaje y de memoria. Por todo ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1. Estudio de la infusión intracerebroventricular (i.c.v.) del A β (25-35) sobre el sistema somatostatinérgico en el hipocampo, corteza frontoparietal y corteza temporal de la rata.**
- 2. Estudio del efecto de la minociclina sobre las alteraciones del sistema somatostatinérgico inducidas por el A β (25-35) en la corteza temporal de la rata.**

La minociclina es una tetraciclina semisintética de segunda generación. Estudios recientes han demostrado que las tetraciclinas poseen una actividad anti-amiloidogénica *in vitro*, siendo capaces de inhibir la formación de agregados amiloideos y de desensamblar fibrillas preformadas. Asimismo, se ha demostrado que la minociclina ejerce un efecto neuroprotector en varios modelos animales de enfermedades neurológicas tales como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson. Por consiguiente, nos planteamos analizar el efecto de este antibiótico sobre el sistema somatostatinérgico en un modelo experimental de la EA.

- 3. Estudio del efecto de la sulfadiazina sobre las alteraciones del sistema somatostatinérgico provocadas por el A β (25-35) en la corteza temporal de la rata.**

En 1967, los autores Hackmann y Ravina demostraron que la administración de sulfadiazina a ancianos producía una mejoría tanto psíquica como física. En base a este hallazgo, nos propusimos evaluar si este antibiótico, una sulfamida de acción corta,



podría tener algún efecto terapéutico sobre las alteraciones del sistema somatostatinérgico en la corteza temporal de la rata inducidas por el A β (25-35).

Para abordar estos estudios, analizamos los principales componentes de la vía de transducción de señales de la SRIF. Con este fin, medimos los siguientes parámetros:

- Niveles tisulares de SRIF-IR mediante radioinmunoanálisis (RIA).
- Expresión del gen de la SRIF a nivel del ARNm detectado mediante RT-PCR.
- Niveles proteicos de p-CREB mediante inmunodetección.
- Parámetros de equilibrio de la unión de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SRIF-14 a receptores específicos de SRIF.
- Expresión de los subtipos de sst1-sst4 a nivel proteico mediante inmunodetección.
- Niveles de ARNm del subtipo sst2 mediante RT-PCR.
- Niveles proteicos de la GRK2 mediante inmunodetección.
- Niveles de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de las proteínas Gi mediante inmunodetección.
- La actividad AC en condiciones basales y estimuladas por FK, así como la inhibición por SRIF de dichas actividades enzimáticas.

Asimismo, se analizaron los niveles proteicos de la enzima neprilisina y el efecto del péptido A β (35-25), una secuencia inversa del A β (25-35), sobre algunos de los componentes del sistema somatostatinérgico cerebral de la rata.

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

Ácido 3-(N-morfolino)propano sulfónico (MOPS)	(Amresco, Ohio, USA)
Ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA)	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-etanosulfónico (HEPES)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Acrilamida	(Serva, Heidelberg, Alemania)
Adenosín 5'-trifosfato (ATP)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Adenosín 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
[H ³]-Adenosín 3',5'-monofosfato cíclico ([H ³] AMPC)	(Du Pont, Boston Ma, USA)
Agarosa	(FMC Bioproducts, Rockland Me, USA)
Albúmina sérica bovina (BSA)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Alúmina	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Anticuerpo anti AC V/VI	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)
Anticuerpo anti-β-actina	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Anticuerpo anti-CREB total	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Anticuerpos anti-Giα ₁ , anti-Giα ₂ y anti-Giα ₃	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)
Anticuerpos anti-GRK2 y anti-GRK6	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)
Anticuerpos anti-nepirilisina.....	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)
Anticuerpo anti-p CREB	(Izasa, Barcelona, España)
Anticuerpos anti-sst1-4	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)
Anticuerpo 2 ^{ario} (IgG anti-cabra conjugado con peroxidasa)	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)
Anticuerpo 2 ^{ario} (IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa)	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)
Anticuerpo 2 ^{ario} (IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Aprotinina	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Azul de bromofenol	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Bacitracina	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
β-mercaptoetanol	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Bisacrilamida	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Bromuro de etidio	(Sigma, St. Louis Mo, USA)



Carbón Norit A	(Serva, Heidelberg, Alemania)
Cloramina T	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Creatín fosfato (CP)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Creatín quinasa (CK)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Desoxirribonucleótidos (dNTPs)	(Invitrogen, Barcelona, España)
Dextrano	(Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, Reino Unido)
Dietilpirocarbonato (DEPC)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Dimetilsulfóxido (DMSO)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
DNA Polimerasa recombinante	(Biotools, Madrid, España)
DNAsa I	(Roche, Mannheim, Alemania)
Dodecil sulfato sódico (SDS)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Formamida desionizada	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Forskolina (FK)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Glicina	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Glicerol	(Panreac Química, Barcelona, España)
Guanosín 5'-trifosfato (GTP)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Inhibidor de tripsina de soja (STI)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Ketamina	(Merial, Barcelona, España)
Kit de extracción de RNA (TriReagent)	(Molecular Research Center, INC, Ohio, USA)
Kit de infusión Alzet II	(Charles River Lab., Barcelona, España)
Kit de quimioluminiscencia	(Sta. Cruz Biothecnology, California, USA)
Leupeptina	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Líquido de centelleo OptiPhase HiSafeII	(Perkin-Elmer, Boston, Ma, USA)
Membranas de nitrocelulosa	(Pall Corporatin, Florida, USA)
Metabisulfito sódico	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Minibomba osmótica Alzet 2002	(Charles River Lab., Barcelona, España)
Minociclina	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
NaI ¹²⁵	(Perkin-Elmer, Boston, Ma, USA)
N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
OligodT	(Invitrogen, Barcelona, España)



Ortovanadato sódico	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Péptido β -amiloide (25-35) ($A\beta(25-35)$)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Péptido β -amiloide (35-25) ($A\beta(35-25)$)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Persulfato amónico	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Pirofosfato sódico	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Transcriptasa Inversa Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV).....	(Invitrogen, Barcelona, España)
Sacarosa	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Sephadex G-25 fino	(Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, Reino Unido)
Somatostatina 14	(Calbiochem, La Jolla, Ca, USA)
Sulfadiazina	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Talco	(Panreac Química, Barcelona, España)
Teofilina	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Trietanolamina (TEA)	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Tris- Hidroximetil-amino-metano (Tween-20)	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Tritón X100	(Sigma, St. Louis Mo, USA)
Tyr ¹¹ -SRIF-14	(Bachem, Bubendorf, Suiza)
Xilacina	(Bayer, Leverkusen, Alemania)



2. ANIMALES Y MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN

2. 1. Animales de experimentación

En el presente trabajo se han utilizado ratas Wistar macho, de 200-250 g de peso, 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 y con ventilación continua. La alimentación que recibieron constaba de pienso granulado (dieta completa de mantenimiento para ratas UAR A04, Panlab); como bebida se les suministró agua corriente *ad libitum*.

2. 2. Modelos de experimentación de la Enfermedad de Alzheimer

2. 2 .1. Modelo agudo

El modelo agudo se induce siguiendo el método de Giovannelli y col. (1995). El péptido A β (25-35) y su péptido inverso A β (35-25) se disuelven en ácido acético al 1%. Se administran 10 μ g de A β (25-35) o de su péptido inverso, mediante una sola inyección, en el ventrículo cerebral izquierdo de la rata. Los animales control recibieron el mismo volumen de vehículo. Las ratas se anestesian con Ketamina (0,08 ml/100g de peso) y Xilacina (0,04 ml/100g de peso). Posteriormente la rata se coloca en un aparato estereotáxico donde se rapa el pelo de la parte superior de la cabeza y se practica una incisión longitudinal del morro al cuello dejando al descubierto las suturas craneales. A continuación, se trazan las coordenadas (AP = - 0,3 mm; L = 1,1 mm desde el bregma) de acuerdo con Rat Brains Atlas de Paxinos y Watson (1956), marcando así el punto de administración. Se taladra el cráneo con una aguja y se inyecta lentamente, por vía i.c.v., mediante una jeringuilla Hamilton, la dosis del péptido anteriormente descrita. Una vez finalizada la administración se sutura al animal. Las ratas se sacrifican a los 7 y 14 días de la intervención.

2. 2. 2. Modelo crónico

El modelo crónico se induce siguiendo el método de Nitta y col. (1994). En este modelo el péptido A β (25-35) o su péptido inverso se administran mediante una infusión i.c.v. continua. Para ello, se utiliza una minibomba osmótica Alzet (Nitta y col., 1994; Nag y col., 1999; Fukuta y col., 2001) que contiene 2 μ l de una solución 2,5 μ g/ μ l del péptido A β (25-35) o su inverso y



198 μ l de ácido acético al 1%. El día antes de la cirugía se incuba la minibomba en suero salino en un baño a 37° C durante toda la noche para calibrarse. Esto permite que la bomba pueda administrar osmóticamente la misma cantidad de péptido durante los días de la infusión. Al día siguiente, se implanta a las ratas la minibomba en el ventrículo cerebral izquierdo, administrando de forma continua 300 pmol/día durante 14 días. A continuación, se marca el lugar de administración llevando acabo los mismos pasos que en el modelo agudo. Una vez taladrado el cráneo, se implanta la cánula que va conectada, mediante un catéter, a la minibomba, que se coloca subcutáneamente en el cuello de la rata. Por último, se sutura a la rata dejando la sutura encima de la cánula para evitar que se salga. A los animales control también se les implanta la minibomba osmótica con 200 μ l de vehículo (ácido acético al 1%). Las ratas se sacrifican a los 14 días de la infusión, tiempo durante el cual habrán recibido 4,2 nmol de A β (25-35) o su inverso.

2.3. Tratamientos

Las ratas del modelo experimental crónico son sometidas a dos tratamientos distintos: un grupo de ratas son tratadas con minociclina y otro grupo de ratas son tratadas con sulfadiazina. La minociclina se disuelve en un volumen de 0,5 ml de suero salino con un pH ligeramente ácido y se inyecta por vía intraperitoneal (i.p.) dos veces al día (45 mg/Kg) 24 horas antes de implantar la minibomba. Se inyecta otra dosis de 22,5 mg/Kg/día durante los 2 últimos días de la infusión continua de A β (25-35), de acuerdo con el método descrito por Yrjänheikki y col. (1999).

El tratamiento con sulfadiazina se realiza de acuerdo con el método descrito por Yrjänheikki y col. (1999), con ligeras modificaciones. La sulfadiazina se disuelve en 1ml de agua bidestilada y se administra por vía intragástrica (Hussain y col., 1985) dos veces al día (160 mg/Kg) (Ravina, 1965). Una segunda dosis de 80 mg/Kg/día se administra durante los dos últimos días de la infusión, es decir, los días 13 y 14.

En ambos casos, las ratas son sacrificadas 24 horas después de recibir la última administración de minociclina o sulfadiazina.



3. EXTRACCIÓN Y DISECCIÓN DEL CEREBRO

3. 1. Extracción del encéfalo

Los animales se sacrifican por decapitación con la 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 sobre hielo.

3. 2. Disección del cerebro

Una vez extraído el cerebro, se procede a la disección de la corteza temporal, parietal, frontal y 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 11, sección 1), descartándolo. A continuación, se obtiene la corteza temporal del lóbulo temporal, que está delimitado caudalmente por la cisura de Silvio, y dorsalmente por la línea perpendicular externa, separándose así del lóbulo parietal y occipital respectivamente. Posteriormente se realiza una sección transversal a nivel del quiasma óptico que pasa a través de la comisura anterior (sección 2), el cual delimita la parte anterior del hipotálamo. Esta sección separa el cerebro en dos partes: B y C (Figura 11).

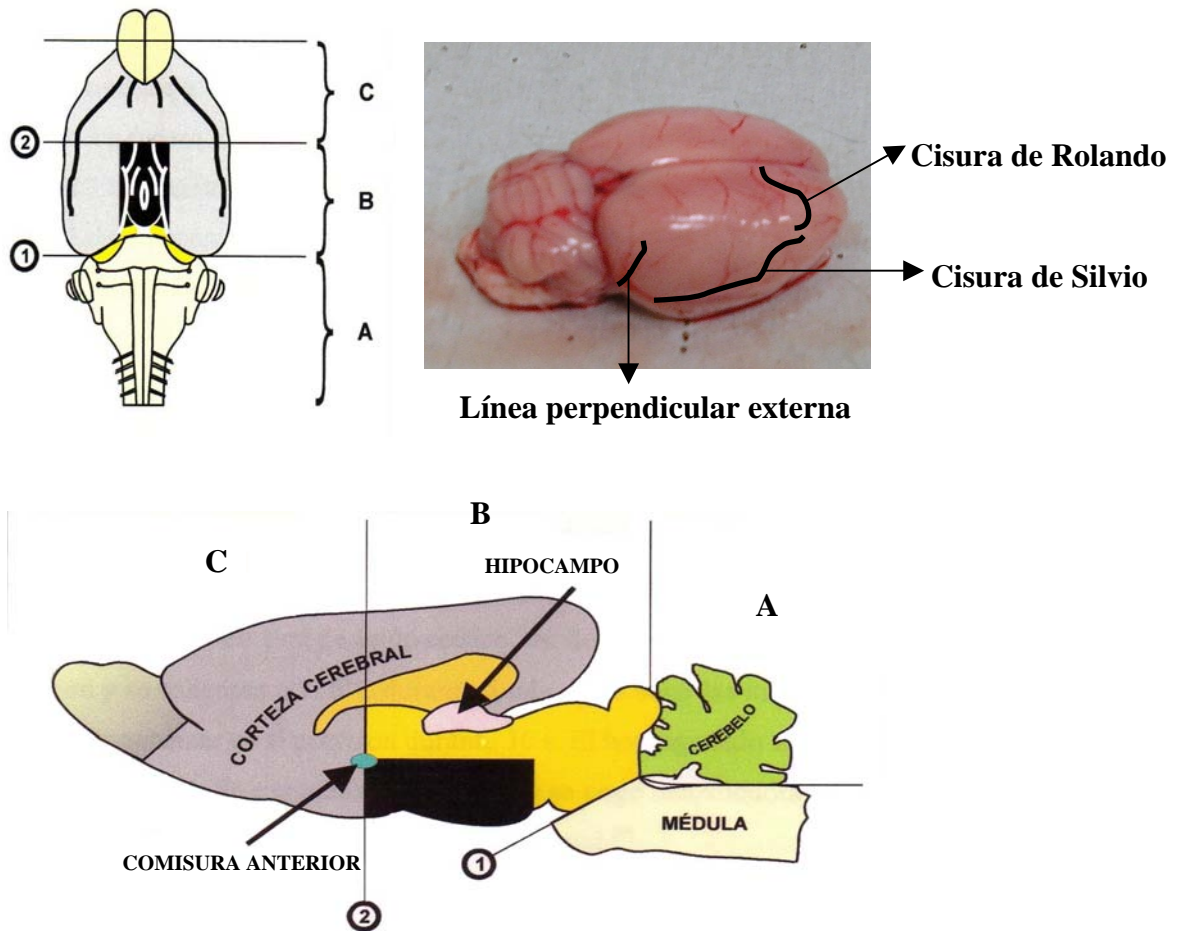


Figura 11. Representación esquemática de la disección del cerebro.

La corteza parietal y frontal se obtiene de los lóbulos parietal y frontal de las partes B y C correspondientes, eliminando la sustancia blanca adherida. Tanto el lóbulo parietal como el frontal están delimitados caudalmente por la cisura de Silvio, El lóbulo parietal, sin embargo, se encuentra en la parte posterior a la cisura de Rolando y el lóbulo frontal en la parte anterior de esta misma cisura. Para aislar el hipocampo, se separa el cerebro medio, quedando así dicha estructura al descubierto.



4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

4. 1. Obtención de membranas cerebrales

El proceso de aislamiento de las membranas cerebrales se lleva a cabo según el método descrito por Reubi y col. (1981). La corteza temporal, parietal, frontal y el hipocampo se suspenden en 6 y 3 ml, respectivamente, de tampón Hepes 10 mM, pH 7,6. El tejido se homogeneiza en un polytron Brinkman en posición 5 durante 15 s. El homogenado se centrifuga a 600 x g, 10 min a 4° C. Se decanta el sobrenadante a otros tubos y se desecha el sedimento. El sobrenadante se centrifuga a 48000 x g durante 30 min a 4° C. El nuevo precipitado se resuspende en 10 ml de Hepes 10 mM, pH 7,6 y se centrifuga en las mismas condiciones descritas anteriormente. El sedimento se resuspende en 530 µl de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 y se distribuye en alícuotas que se conservan a -80° C. Se utiliza una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry y col. (1951).

4. 2. Obtención de la fracción soluble

El extracto celular para la determinación de los niveles de CREB total y p-CREB se obtiene según el método modificado de Hawes y col. (2005).

4. 2. 1. Reactivos

◆ Tampón de lisis (pH 7,5):

- ✓ Triton X 100 1%
- ✓ PMSF 1 mM
- ✓ Aprotinina 5 µg/ ml
- ✓ Leupeptina 5 µg/ ml
- ✓ STI 5 µg/ ml
- ✓ HEPES 20 mM, pH 7,5
- ✓ NaCl 150 mM
- ✓ EDTA 1 mM
- ✓ Ortovanadato sódico (Na_3VO_4) 1 mM
- ✓ Glicerol 5%
- ✓ Pirofosfato sódico 10 mM



4. 2. 2. Método

Se extrae una pequeña muestra de tejido, se resuspende en 500 µl de tampón de lisis y se sonica la muestra durante 15 s. A continuación, se incuba el extracto durante 30 min a 4°C en agitación. Se centrifuga dicho extracto durante 15 min a 16000 x g y se hacen alícuotas de la fracción soluble. Por último se determina la concentración de proteínas por el método de Lowry y col. (1951).

5. DETERMINACIÓN DE LA SOMATOSTATINA TISULAR

5. 1. Extracción de la somatostatina tisular

La extracción de la SRIF tisular se realiza mediante el método modificado de Patel y Reichlin (1978). Una vez aislada la corteza temporal, parietal, frontal y el hipocampo, se deposita el tejido en tubos de borosilicato que contienen 1 ml de ácido acético 2 N. Se homogeneizan las muestras durante 30 s con un polytron Brinkman y se calientan a 100° C durante 5 min. Tras dejar las muestras 5 min en hielo se vuelven a homogeneizar en el polytron durante 30 s. El homogenado se centrifuga a 15000 x g durante 5 min, a 4° C. Se recoge el sobrenadante y se alícuota. Las alícuotas se guardan a -20° C hasta el día del ensayo. Se emplea una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry y col. (1951).

5. 2. Determinación de la concentración de somatostatina tisular

5. 2. 1. Reactivos

◆ Tampón de RIA

- ✓ Tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,2
- ✓ EDTA 10 mM
- ✓ BSA 0,3%

5. 2. 2. Método

La concentración de SRIF tisular se determina siguiendo un método modificado de Patel y Reichlin (1978). Dicha determinación se realiza en tubos de borosilicato que contienen:

✓ 100 µl de extracto tisular (convenientemente diluido) ó 100 µl de SRIF a concentración de 0 a 1000 fmol/tubo (curva patrón), todo ello diluido en tampón RIA.



- ✓ 400 µl de tampón RIA
- ✓ 100 µl de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SRIF diluida en tampón RIA (aproximadamente 6000 cpm/tubo)
- ✓ 200 µl de anticuerpo anti-SRIF

Además, se preparan cuatro tubos de actividad total que sólo contienen 100 µl de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SRIF-14, dos tubos para el inespecífico de la curva patrón que llevan 700 µl de tampón RIA y 100 µl del péptido marcado, y dos tubos para el inespecífico de las muestras que contienen 600 µl de tampón RIA, 100 µl del extracto tisular y 100 µl del péptido marcado. Todos los tubos se incuban a 4° C durante 24 h; transcurrido este tiempo, se añade a todos los tubos, excepto a los de actividad total, 1 ml de carbón activo (2%)/dextrano (0,2%). Se dejan reposar los tubos en hielo durante 15 min y después se centrifugan a 2000 x g durante 10 min, para separar la fracción unida de la no unida al anticuerpo. Finalmente, se aspira el sobrenadante y la radiactividad en el pellet se mide en un contador de radiactividad γ (Wallac Pharmacia 1282 Compugamma CS).

6. MARCAJE DE TYR¹¹-SOMATOSTATINA-14 CON NaI¹²⁵

El marcaje de la Tyr^{11} -SRIF-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 filtración en gel con una columna de Sephadex G-25 fino.

6. 1. Preparación de reactivos

◆ Tyr¹¹-Somatostatina- 14

Se disuelven 0,5 mg de Tyr^{11} -SRIF-14 en 0,5 ml de ácido acético 0,1 M. A 100 µl de la solución del péptido se le añaden 300 µl de tampón acetato sódico 0,1 M a pH 7,4. De esta solución se utilizarán 10 µl para el marcaje.

◆ Cloramina T (C₇H₇CINNaO₂.S.H₂O)

La Cloramina T (10 mg) se disuelve en 5 ml de tampón fosfato potásico 0,3 M, pH 7,5. Se prepara 10 min antes del marcaje y se deja en oscuridad hasta su uso. Se emplea como un oxidante débil.

◆ Metabisulfito sódico (Na₂S₂O₅)

El metabisulfito sódico se prepara disolviendo 20 mg de dicho compuesto en 5 ml de tampón fosfato potásico 0,3 M, pH 7,5. El metabisulfito se emplea como reductor para detener la reacción de oxidación desencadenada por la Cloramina T.



- ◆ **Tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4 que contiene 0,25% de BSA**
- ◆ **Tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4 que contiene 5% de talco**

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 h, tras lo cual se deja reposar para eliminar, posteriormente, el agua. A este Sephadex, se le añaden 50 ml de ácido acético 0,1 M que contiene BSA al 0,1% y se deposita en una columna de vidrio de 1 x 45 cm, hasta conseguir una altura aproximada de 40 cm. Una vez empaquetada la columna, se equilibra con 50 ml de ácido acético 0,1 M que contiene BSA al 0,1%.

6. 3. Marcaje

La reacción de marcaje tiene lugar a temperatura ambiente, en un tubo de microfuga en el que se habrán añadido previamente 10 μl de Tyr¹¹-SRIF-14 (2,5 μg). A este tubo se le añaden 40 μl de tampón fosfato potásico 0,3 M, pH 7,5. A continuación, se retiran 10 μl para que la cantidad de Tyr¹¹-SRIF-14 que quede para el marcaje sea de 2 μg . Posteriormente, se adiciona 1 mCi de NaI¹²⁵ y 5 μl de la disolución de Cloramina T, agitándose la mezcla durante 30 s. Finalmente, se agregan 5 μl de la disolución de metabisulfito sódico y 200 μl de ácido acético 0,1 M con BSA 0,1%. Se toma una alícuota de 1 μl 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 ¹²⁵I al péptido mediante el test de adsorción al talco.

6. 4. Purificación

Tras dejar fluir el tampón que se encuentra por encima del Sephadex G-25 en la columna, se añade la mezcla de reacción, esperando a que penetre en la columna. Se eluye con ácido acético 0,1 M que contiene BSA al 0,1%, recogiendo en el colector de fracciones alícuotas de 1 ml. Se toman alícuotas de 10 μl de cada tubo para su conteo en el contador gamma (Figura 12). Finalmente, se mezclan todos los tubos que dieron mayor incorporación de ¹²⁵I y se reparte el volumen resultante en alícuotas de 0,2 ml, que se conservan a -20° C.

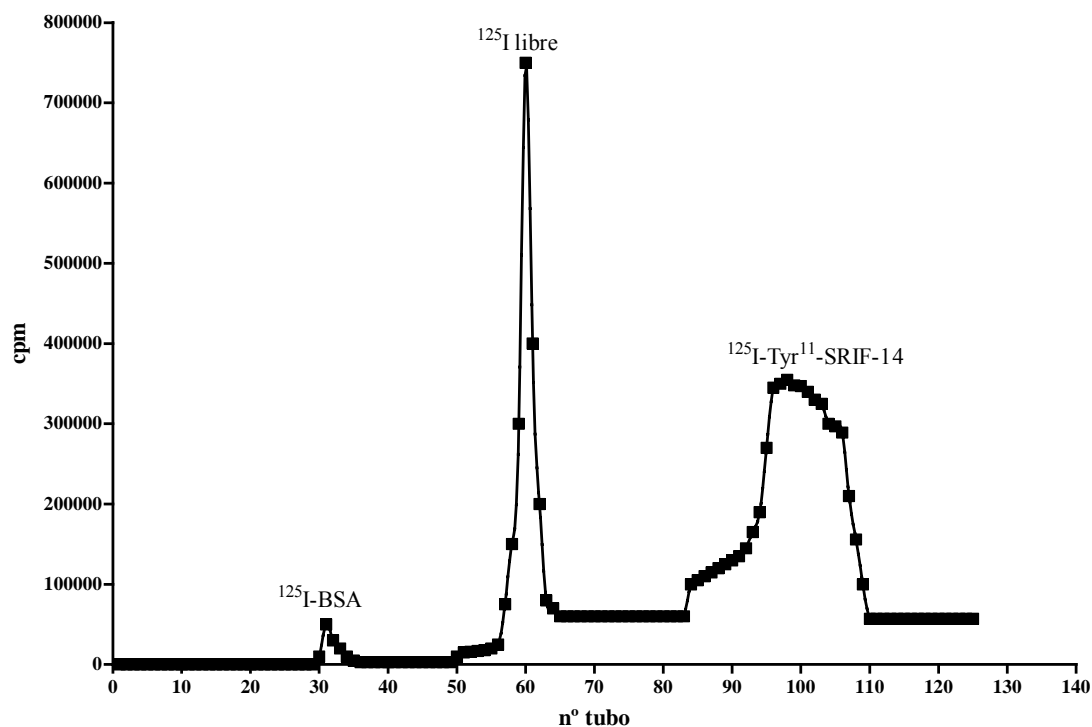


Figura 12. Purificación de la SRIF marcada con ^{125}I en una columna de sephadex G-25.

6. 5. Test de adsorción a talco

A 1 μl de la mezcla de reacción, cuya radiactividad se ha contado previamente, (c.p.m. totales), 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 min a 750 x g, se aspira el sobrenadante y se mide la radiactividad en el sedimento. 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 del I^{125} (% I) se calcula mediante la siguiente fórmula:

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



7. ENSAYOS DE UNIÓN DE LA SOMATOSTATINA A SUS RECEPTORES ESPECÍFICOS EN MEMBRANAS DE HIPOCAMPO, CORTEZA FRONTAL, PARIETAL O TEMPORAL

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

7. 1. Reactivos

◆ **Ácido acético 0,1 M que contiene BSA 0,1%**

◆ **Tampón de incubación (pH 7,5):**

- ✓ Tris-HCl 50 mM
- ✓ MgCl₂ 6 H₂O 5 mM
- ✓ BSA 0,2%
- ✓ Bacitracina 0,1 mg/ml

◆ **Curva de somatostatina fría**

A partir de una alícuota de SRIF ($6,1 \times 10^{-4}$ M) disuelta en ácido acético 0,1 M que contiene BSA 0,1%, se prepara una curva de SRIF en tampón de incubación a concentraciones finales de 10^{-11} hasta 10^{-7} M. Esta última concentración se utiliza para estudiar la unión inespecífica.

◆ **¹²⁵I-Tyr¹¹-SRIF-14**

Se diluye una alícuota de ¹²⁵I-Tyr¹¹-SRIF-14 en tampón de incubación para obtener una concentración final sea de 250 pM.

◆ **Membranas cerebrales**

La membranas obtenidas por el método ya descrito en el apartado 4.1 se resuspenden en tampón de incubación a una concentración final de proteínas de 0,15 mg/ml.

7. 2. Método

Se realizan incubaciones en tubos Beckman en un volumen final de 250 µl. Los reactivos se añaden en el siguiente orden y volumen:

- ✓ 175 µl de tampón de incubación
- ✓ 25 µl de SRIF fría (10^{-11} - 10^{-7} M). En los "ceros", se añade 25 µl de tampón de incubación



- ✓ 25 µl de ^{125}I -Tyr¹¹-SRIF-14 (250 pM) en tampón de incubación

La reacción se inicia añadiendo 25 µl de la correspondiente preparación de membranas. Los tubos se incuban 60 min en un baño a 30° C sin agitación. Al cabo de este período, las muestras se centrifugan en una microfuga a 11000 x g durante 2 min. Se aspira el sobrenadante y se lava el pellet con Tris/sacarosa (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 y sacarosa 9%), determinándose las c.p.m. en un contador γ (Wallac Pharmacia 1282 Compugamma CS) con una eficacia de conteo para el ^{125}I del 86%.

Los experimentos se acompañan de tubos que contienen únicamente 25 µl de ^{125}I -Tyr¹¹-SRIF-14 que representan la actividad total. Los resultados se expresan como porcentaje de ^{125}I -Tyr¹¹-SRIF-14 unido específicamente respecto a la actividad total (% B específico = % B total - % B inespecífico).

8. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas se separan mediante electroforesis de tipo vertical en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), según el método descrito por Laemmli (1970).

8. 1. Reactivos

◆ TTBS (pH 7,5):

- ✓ Tris-HCl 50 mM
- ✓ NaCl 150 mM
- ✓ Tween-20 0,05%

◆ Acrilamida/bisacrilamida 29,2:0,8

◆ Tampón de muestras (pH 6,8):

- ✓ Tris-HCl 60 mM
- ✓ SDS 3%
- ✓ glicerol 10%
- ✓ azul de bromofenol 0,003%
- ✓ β -mercaptoetanol 1%

◆ 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**

8. 2. Método

- ◆ **Preparación de los geles**

- ◆ **Gel separador (12%):**

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

- ◆ **Gel concentrante (5%):**

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

- ◆ **Preparación de las muestras**

Se toma un volumen determinado de las muestras que contienen 100 µg de proteínas y se centrifuga durante 5 min a velocidad máxima en una microfuga. A continuación, se aspira el sobrenadante y el precipitado se resuspende en tampón de muestra obteniendo una concentración final de 5 µg/µl. En ambos tipos de muestras, la cantidad de proteína a cargar en el gel es de 100 µg. Previo a cargar las muestras en el gel, éstas se calientan a 100° C durante 5 min, con el fin de desnaturalizar las proteínas.

**◆ Electroforesis**

La electroforesis se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 90 min a 100 V en tampón de electroforesis.

◆ Transferencia

Las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un campo eléctrico de 15 V durante toda la noche en tampón de transferencia.

◆ Western blot

Las membranas de nitrocelulosa se bloquean con TTBS/leche 5% durante 90 min en agitación a 4° C. Una vez bloqueados los sitios de unión inespecíficos, la membrana se incuba durante toda la noche a 4° C con el anticuerpo primario específico de la proteína objeto de estudio (dilución 1:1000). Al día siguiente, se retira el anticuerpo primario correspondiente y las membranas se lavan una vez con TTBS y tres veces más con TTBS/leche 5% durante 5 min. Posteriormente, se incuban las membranas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y diluido 1:2000, durante 1 h a 4° C. Finalmente, se retira el anticuerpo secundario y se realizan seis lavados de 5 min con TTBS para eliminar completamente los restos de anticuerpo. El revelado de los western blots se lleva a cabo utilizando un kit de quimioluminiscencia (Sta. Cruz Biothecnology).

En la siguiente tabla se recogen los distintos tipos de anticuerpos utilizados:

Proteínas a estudiar	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
sst1-4	policlonal	anti-cabra
Gα1	monoclonal	anti-ratón
Gα2	monoclonal	anti-ratón
Gα3	policlonal	anti-conejo
GRK2	monoclonal	anti-ratón
CREB total	monoclonal	anti-conejo
p-CREB	monoclonal	anti-conejo
AC I	policlonal	anti-conejo
AC V/VI	policlonal	anti-conejo
AC VIII	policlonal	anti-cabra
Neprilisina	monoclonal	anti-ratón



Una vez detectadas las proteínas, se eliminan los anticuerpos de la membrana de nitrocelulosa mediante numerosos lavados con TBS (tampón TTBS sin Tween-20). A continuación, se incuban las membranas con el anticuerpo primario anti- β -tubulina diluido 1:5000 con el objeto de establecer un control de carga de las muestras.

9. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA

El estudio de la actividad AC se ha llevado a cabo de acuerdo con el método de Houslay y col. (1976) con pequeñas modificaciones.

La medida de la actividad AC se realiza cuantificando el AMPc producido mediante el método de la proteína enlazante. Dicho método consiste en establecer una competición entre el AMPc producido y el AMPc que se añade al medio, para unirse a las subunidades reguladoras de la PKA.

9. 1. Reactivos

◆ **Trietanolamina (TEA) 25 mM, pH 7,4**

◆ **TEA 25 mM, pH 7,4/BSA 0,1%**

◆ **Reactivo 1**

Contiene EDTA 6 mM y MgSO₄ 30 mM disueltos en TEA 25 mM, pH 7,4

◆ **Reactivo 2**

Se prepara disolviendo 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 6 mM, bacitracina 6 mg/ml y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,6 mM en TEA 25 mM, pH 7,4

◆ **Creatín fosfato (CP)**

La CP se utiliza a una concentración de 90 mg/ml, preparado en TEA 25 mM, pH 7,4

◆ **Creatín quinasa (CK)**

La CK se prepara a una concentración de 12 mg/ml, preparado en TEA 25 mM, pH 7,4

◆ **Guanosín 5'-trifosfato (GTP)**

Se prepara a una concentración de 10 μ M en TEA 25 mM, pH 7,4

◆ **Adenosín 5'-trifosfato (ATP)**

Se prepara a una concentración de 1,5 mM en TEA 25 mM, pH 7,4

◆ **Cóctel:**

- ✓ 1 volumen de reactivo 1



- ✓ 1 volumen de reactivo 2
- ✓ 0,5 volúmenes de CP
- ✓ 0,5 volúmenes de CK
- ✓ 0,006 volúmenes de GTP

◆ **Medio de la curva:**

- ✓ 1 volumen de reactivo 1
- ✓ 1 volumen de reactivo 2
- ✓ 1,6 volúmenes de TEA 25 mM, pH 7,4
- ✓ 0,4 volúmenes de ATP 1,5 mM

◆ **Medio de dilución:**

- ✓ 1 volumen de reactivo 1
- ✓ 1 volumen de reactivo 2
- ✓ 2 volúmenes de TEA 25 mM, pH 7,4

◆ **Alúmina**

Se prepara la suspensión de alúmina a una concentración de 0,75 mg/ml en TEA 25 mM, pH 7,4

◆ **Solución PK:**

- ✓ 100 ml de tampón fosfato 0,2 M, pH 6,5
- ✓ 2 g de BSA
- ✓ 0,186 g de EDTA
- ✓ 0,0144 g de teofilina
- ✓ 41 µl de β- mercaptoetanol

◆ **Adenosín monofosfato cíclico (AMPC)**

Se parte de una preparación monohidratada de AMPC y se disuelve en tampón fosfato 0,2 M, pH 6,5 a una concentración de 1 nmol/ml.

◆ **Somatostatina-14 (SRIF-14)**

Se utiliza la SRIF 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 (FK)**

A partir de una alícuota de FK 10^{-2} M disuelta en DMSO, se preparan diluciones progresivas con TEA 25 mM pH 7,4, con objeto de alcanzar una concentración final de 10^{-5} M.

◆ **[³H]-AMPC**



Se diluye una preparación comercial de [^3H]-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 [^3H]-AMPc 1/16 en tampón fosfato 0,05 M, pH 6,5.

◆ Curva estándar de AMPc

Para construir la curva patrón, el AMPc frío se diluye con el medio de la curva (Figura 13). El rango de concentraciones de AMPc utilizado oscila entre 5 y 300 pmol/ml (eje de abscisas). En ordenadas se representa el porcentaje de [^3H]-AMPc unido a la PKA con respecto a la radiactividad total.

◆ Obtención de la proteína quinasa A

Se realizó 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. Se homogeneiza el tejido en 2,5 volúmenes de EDTA pH 7 en un homogeneizador de aspas (Omni-Mixer de Dupont Instruments) a velocidad máxima durante 2 min en hielo. El homogeneizado se filtra a través de una gasa doble y el filtrado se centrifuga a 8000 x g durante 15 min, a 4° C. Se desecha el precipitado y el sobrenadante se centrifuga 30 min a 10000 x g a 4° C. Se desecha el precipitado y el sobrenadante se lleva a pH 6,1 con ácido acético 1 N. Se deja reposar la solución 1 h en hielo para que se produzca la precipitación; el precipitado corresponde a la fosforilasa quinasa y a la glucógeno sintetasa. Posteriormente, se centrifuga el tubo a 10000 x g durante 30 min 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 en hielo 1 h. Se vuelve a centrifugar el tubo a 10000 x g durante 30 min 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido (32,5 g por cada 100 ml de sobrenadante) para precipitar proteínas. Se mantiene la mezcla en agitación 2 h, se centrifuga a 10000 x g durante 1 h 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 el extremo superior y inferior y se dializa durante 48 h a 4° C en 20 volúmenes del mismo tampón, cambiando el tampón cada 12 h. A las 48 h, el dializado se centrifuga a 10000 x g durante 30 min a 4° C y se recoge el sobrenadante que contiene la PKA; se preparan alícuotas de 200 μl de PKA y se conservan a -20° C.

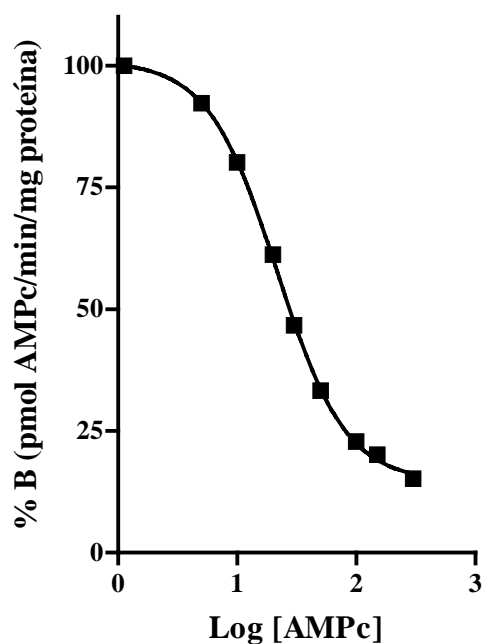


Figura 13. Curva estándar para la valoración de la producción de AMPc, por el método de la proteína enlazante.

◆ 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 y 1/40) y se valora su capacidad de unión al [³H]-AMPc en presencia de cantidades crecientes de AMPc frío (5, 10, 20, 30, 50, 100, 150 y 300 pmol). En el caso de los resultados mostrados en la figura 14, se eligió la dilución 1/40 por presentar una sensibilidad adecuada para la valoración del AMPc.

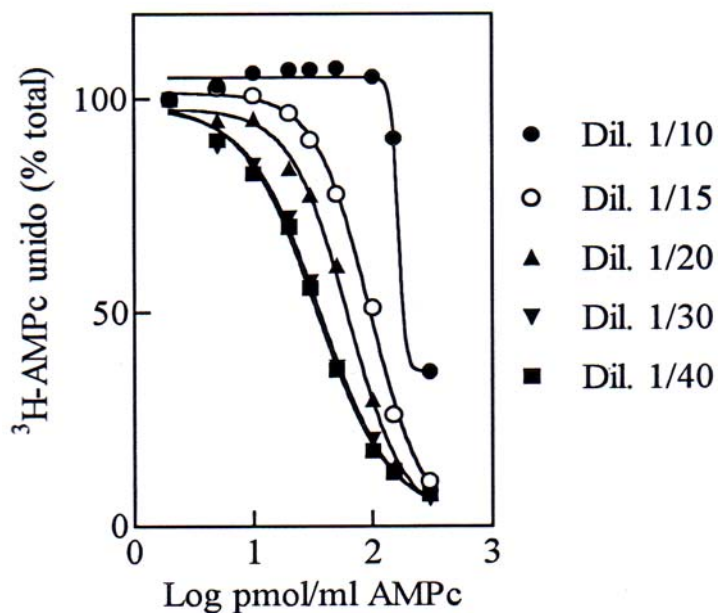


Figura 14. Curvas de desplazamiento de la unión de [³H]-AMPc a la PKA a diferentes diluciones de la misma.

◆ Suspensión de carbón activo

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

9. 2. Método

Todas las pruebas se realizan por duplicado. Las membranas de las distintas áreas cerebrales se incuban en un volumen final de 100 μ l que contiene:

	10 μ l	10 μ l	50 μ l
1, 2 (Basal)	TEA 25 mM	TEA 25 mM + BSA	CÓCTEL
3, 4 (Inhibición del basal)	TEA 25 mM	SRIF 10 ⁻⁴ M	CÓCTEL
5, 6 (Estimulado)	FK 10 ⁻⁵ M	TEA 25 mM + BSA	CÓCTEL
7, 8 (Inhibición del estimulado)	FK 10 ⁻⁵ M	SRIF 10 ⁻⁴ M	CÓCTEL



Se añaden a todos los tubos 20 μ l de membranas procedentes del hipocampo, corteza frontal, parietal o temporal a una concentración final de 0,03 mg/ml disueltas en TEA 25 mM, pH 7,4. La reacción se inicia añadiendo 10 μ l de ATP 1,5 mM a los tubos previamente atemperados (4-5 min) y se incuban 15 min a 30° C en un baño con agitación. La reacción se detiene por desnaturalización de las proteínas a 90° C durante 3 min. Se dejan enfriar los tubos y se añaden 200 μ l de la suspensión de alúmina. Posteriormente, se centrifugan a 2060 x g durante 10 min a 4° C. Es necesario realizar diluciones de los sobrenadantes de las muestras, con el medio de dilución, para poder interpolar los valores en la curva estándar. Las diluciones recomendadas son las siguientes:

- ◆ Basal e inhibido del basal, dilución 1/3
- ◆ Estimulado e inhibido del estimulado, dilución 1/15

Se toman 50 μ l de los sobrenadantes de la curva estándar y 50 μ l de las diluciones anteriores. Se añaden 50 μ l de la PKA diluida y se incuban los tubos durante 90 min a 4° C para conseguir la unión del AMPc a la PKA. Posteriormente, se adicionan 50 μ l de [³H]-AMPc 0,00625 M y se incuban a 4° C durante 2 h. A continuación, se añaden 150 μ l de la suspensión de carbón activo (excepto a los dos tubos de actividad total) y se mantienen los tubos a 4° C durante 10-15 min. Se centrifuga a 2060 x g durante 10 min a 4° C. Se recogen 200 μ l de sobrenadante 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).

10. ANÁLISIS DEL ARN DE LA SOMATOSTATINA Y DEL SUBTIPO SST2

10. 1. Extracción de ARN y digestión con DNAsa I

10. 1. 1. Reactivos

- ◆ **TriReagent**
- ◆ **Cloroformo**
- ◆ **Isopropanol**
- ◆ **Etanol 75%**
- ◆ **Agua DEPC 0,01%**
- ◆ **DNAsa I**
- ◆ **Tampón de la enzima (pH 7,6)**



- ✓ Tris-HCl 500 mM
- ✓ MgCl₂
- ✓ Glicerol
- ◆ **Tampón de parada (pH 8,0)**
 - ✓ EDTA 500 mM
 - ✓ SDS 2%
 - ✓ Agua DEPC
- ◆ **Etanol frío**
- ◆ **Acetato sódico 3 M**

10. 1. 2. Método

El ARN total de la corteza temporal se aísla mediante el método de la guanidina isotiocianato, utilizando un kit comercial (TriReagent). Se aísla el tejido y se homogeneiza en un Potter con 1 ml de TriReagent por cada 50-100 mg de tejido aislado. El homogenado se pasa a un tubo Eppendorf y se mantiene a temperatura ambiente para deshacer los complejos nucleoprotéicos. Se añaden al tubo 200 µl de cloroformo, se agita durante 15 s, y se deja sedimentar el homogenado durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifuga el tubo a 12000 x g durante 15 min a 4° C. Se recoge la fase acuosa y se transfiere a un tubo estéril. Para precipitar el ARN presente en la fase acuosa, se añaden 500 µl de isopropanol y se mantiene el tubo durante 10 min a temperatura ambiente. Se vuelve a centrifugar la mezcla a 12000 x g durante 8 min y se lava el precipitado resultante en 1ml de etanol al 75%; se vuelve a centrifugar el tubo a 7500 x g durante 5 min a 4° C. Finalmente, el precipitado se seca y se resuspende en 50 µl de agua DEPC. A continuación se realiza una digestión con DNAsa I con el objetivo de eliminar la posible contaminación con ADN. Para ello se toman 20 µg del precipitado obtenido anteriormente y se añaden 10 µl de tampón de la enzima y 10 µl de DNAsa I, todo ello diluido en agua DEPC. Se incuba el tubo 30 min a 37° C. La reacción se detiene añadiendo 10 µl de tampón de parada y enfriando el tubo en hielo. Después, se precipita el ARN para eliminar los restos de la enzima. Para ello, se añade un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (1:1:0,02) y se centrifuga a velocidad máxima durante 15 min. Se recoge la fase acuosa y se añaden 2,5 volúmenes de etanol frío y 1/10 de acetato sódico y se deja incubando toda la noche a -20° C. Al día siguiente, se centrifuga el tubo a 12000 x g durante 15 min a 4° C y se lava el sedimento con 1 ml de etanol al 75%. Por último, se repite el



lavado y la centrifugación, se deja secar a temperatura ambiente y se resuspende el precipitado en 45 μ l de agua DEPC, y se guardan las muestras a -80° C hasta el día del ensayo.

Finalmente se determina la cantidad y calidad del ARN midiendo la relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm. Para el cálculo de la concentración de ARN se considera que una unidad de absorbancia (D.O.) a 260 nm corresponde a 40 μ g/ml de ARN. Para ver el grado de pureza del ARN extraído, se mide la absorbancia a 280 nm y se calcula la relación 260/280, la cual debe oscilar entre 1,8 y 2.

10. 2. Integridad del ARN

10. 2. 1. Reactivos

◆ Tampón de muestra para ARN

- ✓ Agua DEPC.....70 μ l
- ✓ Formamida desionizada.....250 μ l
- ✓ MOPS 10X.....50 μ l
- ✓ Formaldehído 37%.....80 μ l
- ✓ Bromuro de etidio (puro).....1 μ l
- ✓ Azul de bromofenol (0,2 mg/ml) disuelto
en glicerol 50%- agua DEPC 50%....100 μ l

◆ Preparación del gel de Agarosa

- ✓ Agarosa.....1 g
- ✓ MOPS 10X.....10 ml
- ✓ Agua DEPC.....85 ml
- ✓ Formaldehído.....5,4 ml

10. 2. 2. Método

Una vez aislado el ARN y digerido con DNAsa I, se comprueba la integridad del ARN. Para ello, se toma 1 μ g de ARN al que se añaden 2 μ l de tampón de muestra completando con agua DEPC hasta un volumen final de 12 μ l. A continuación, se calientan las muestras a 65° C durante 5min, con objeto de eliminar estructuras secundarias del ARN. Por último, se realiza una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en MOPS 1X a 150 voltios.



Si el ARN está intacto, se observan dos bandas, una correspondiente al ARN ribosómico (ARNr) 28S y otro al ARN r 18S siendo la banda del ARNr 28S el doble de intensa que la del 18S (Figura 15).

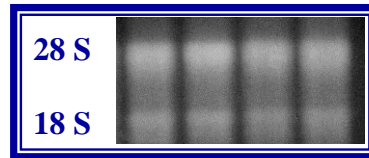


Figura 15. Película representativa de la integridad del ARN, donde se observan las dos bandas intactas correspondientes al ARN ribosómico 28S y 18S.

10. 3. Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa

10. 3. 1. Transcripción inversa

Para la obtención del ADN copia (ADNc), se utiliza material esterilizado y libre de DNAsas y RNAsas. El método consta de los siguientes pasos:

Paso 1: A 1µg de ARN se le añade 1µl de OligodT (primers) 0.5 mg/ml, 1 µl de una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) 10 mM y agua estéril (sin DEPC), hasta completar un volumen final de 12 µl. Esta mezcla se incuba en un baño seco a 65° C durante 5 min y después, se enfría rápidamente en hielo.

Paso 2: A la mezcla anterior, se le añaden 4 µl de tampón de reacción 5X, pH 8,3 (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM y MgCl₂ 15 mM), 2 µl de DTT 0,1 M y 1 µl de inhibidor de RNAsa (40 unidades/µl). La mezcla se agita suavemente y se incuba a 37° C durante 2 min.

Paso 3: Se añade 1 µl de la transcriptasa inversa del virus *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV) (200 unidades/µl) y se realiza una incubación a 37° C durante 50 min. Después, se detiene la reacción calentando las muestras a 70° C durante 15 min.

10. 3. 2. Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR se realiza a partir de 3 µl del producto de reacción de la RT. Se utiliza un tampón de PCR (pH 9,0) formado por:

- ✓ Tris-HCl 75 mM
- ✓ KCl 50 mM
- ✓ (NH₄)₂SO₄ 20 mM



✓ MgCl₂ 2 mM

al que se añade 10 mM de una mezcla de dNTPs, 10 μM de cada primer y 2,5 U de DNA polimerasa recombinante modificada de la enzima homónima de la bacteria termófila *Thermus thermophilus*.

Los primers fueron sintetizados por el Servicio de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá. Las secuencias de los primers elegidos se recogen en la siguiente tabla (Khare y col., 1999; Schwartz y Vallejo, 1998; Karbownick y col., 2005):

Genes	Sentido 5' - 3'	Antisentido 5' - 3'
SRIF	GAC CCA CCG CGC TCA AGC TCG GCT G	AAC AGG ATG TGA ATG TCT TCC AGA A
sst2	AGC AAC GCG GTC CTC ACG TT	GGA GGT CTC CAT TGA GGA GG
β - Actina	TGA CCC AGA TCA TGT TTG AGA	ACT CCA TGC CCA GGA AGG A

Se introducen los tubos en un termociclador y se someten a distintas condiciones de amplificación, según el gen. En el caso de la amplificación del gen que codifica para la SRIF, las condiciones son las siguientes:

- ◆ 95° C durante 5 min
- ◆ 30 ciclos de 94° C 30 s, 55° C 30 s, 72° C 1 min
- ◆ 72° C durante 5 min.

Las condiciones para amplificar el gen que codifica para el subtipo sst2 son:

- ◆ 94° C durante 10 min
- ◆ 30 ciclos de 94° C 1min, 55° C 30 s, 72° C 1min 30 s
- ◆ 72° C durante 10 min.

Una vez finalizada la PCR se añaden 10 μl de tampón de carga 6X a cada muestra. Para visualizar y comprobar el tamaño de los productos de la PCR, se toman 20 μl de cada muestra para hacer una electroforesis en gel de agarosa. En el caso del gen de la SRIF (356 pb) se realiza la electroforesis en un gel de agarosa con gradiente de densidad (2%-1,5%-1%) y para el gen del sst2 (973 pb) en gel de agarosa al 1%. Las bandas se observan por la exposición a luz ultravioleta del gel previamente teñido con bromuro de etidio. La calidad y equivalencia de las muestras de ADNc se verifican utilizando primers para amplificar el gen de β-actina (484 pb).

RESULTADOS



RESULTADOS

1. HIPOCAMPO

1. 1. Modelo agudo

La administración de una sola dosis del A β (25-35) por vía i.c.v. (10 μ g) no ejerció ningún efecto significativo sobre el contenido de SRIF-IR en el hipocampo de la rata a los 7 ó 14 días de la inyección (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de la infusión i.c.v. de una sola dosis del A β (25-35) (10 μ g) a los 7 o 14 días de su administración sobre el contenido de SRIF-inmunorreactiva (SRIF-IR) en el hipocampo de la rata.

<u>Grupos</u>	<u>SRIF-IR (ng/ mg proteína)</u>	
	<u>7 días</u>	<u>14 días</u>
Control	18,2 \pm 1,7	20,3 \pm 0,8
Aβ(25-35)	19,9 \pm 0,6	19,8 \pm 0,9

Los valores se expresan como la media \pm E.S.M. de cinco experimentos por duplicado. Estadísticamente, no hay diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Estudios iniciales con membranas procedentes del hipocampo mostraron que la unión del trazador 125 I-Tyr 11 -SRIF-14 a sus receptores era dependiente del tiempo, alcanzándose un equilibrio aparente a los 60 min, a 30° C y permaneciendo estable durante al menos 120 min. Por consiguiente, todos los estudios posteriores se llevaron a cabo a 30° C durante 60min. En las membranas de hipocampo procedentes de las ratas tratadas con el A β (25-35), no se observaron cambios significativos ni en el número de receptores de SRIF ni en la constante de disociación, con respecto al grupo control (Tabla 7). Las membranas hipocampales del grupo control y del grupo de ratas tratadas con el A β (25-35) presentaron niveles similares de degradación de SRIF.



Tabla 7. Parámetros de equilibrio de la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de hipocampo procedentes de ratas control y ratas tratadas con una sola dosis del A β (25-35) (10 μ g) a los 7 o 14 días de su administración.

<u>Grupos</u>	<u>Receptores de SRIF</u>	
	<u>Bmax</u>	<u>Kd</u>
Control	537 \pm 6	0,52 \pm 0,03
Aβ(25-35) (7 días)	472 \pm 31	0,54 \pm 0,04
Control	415 \pm 40	0,53 \pm 0,04
Aβ(25-35) (14 días)	476 \pm 36	0,58 \pm 0,06

Los parámetros de unión se calcularon a partir del análisis de Scatchard por regresión lineal. Las unidades para la Kd son nM y para la Bmax femtomoles de SRIF unida por mg de proteína. Los valores se expresan como la media \pm ESM de cinco experimentos, realizados por duplicado. Estadísticamente, no hay diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Dado que la enzima AC es uno de los principales efectores de la SRIF, se planteó averiguar si el tratamiento agudo con el A β (25-35) (10 μ g) podría alterar la actividad de dicha enzima en condiciones basales y estimuladas por FK, en membranas de hipocampo. No se detectaron cambios significativos ni en la actividad AC basal ni en la actividad AC estimulada por FK a los 7 días de la inyección del péptido. Sin embargo a los 14 días, se observó una ligera disminución de la actividad enzimática estimulada por FK, así como una disminución en la capacidad de la SRIF para inhibir dicha actividad, en comparación con el grupo control (Tabla 8).



Tabla 8. Efecto de la somatostatina (SRIF, 10^{-4} M) y de la forskolina (FK, 10^{-5} M) sobre la actividad adenilato ciclasa (AC) (pmol AMPc/min/mg de proteína) en membranas de hipocampo procedentes de ratas control (n=5) y de ratas tratadas con una sola dosis del A β (25-35) (10 μ g) (n=5) a los 7 o 14 días de su administración.

	Actividad adenilato ciclasa (pmol AMPc/min/mg proteína)			
	7 días		14 días	
	<u>Control</u>	<u>Aβ(25-35)</u>	<u>Control</u>	<u>Aβ(25-35)</u>
Actividad basal	332 \pm 22	304 \pm 38	267 \pm 27	253 \pm 35
+10⁻⁴ M SRIF	236 \pm 14	212 \pm 31	189 \pm 10	173 \pm 7
+10⁻⁵ M FK	851 \pm 63	818 \pm 75	889 \pm 28	796 \pm 24 *
+10⁻⁵ M FK+ 10⁻⁴ M SRIF	591 \pm 75	563 \pm 38	589 \pm 68	574 \pm 44
Veces de estimulación	2,6 \pm 0,3	2,7 \pm 0,4	3,2 \pm 0,3	3,1 \pm 0,4
% de Inhibición por SRIF de la actividad AC basal	28,6 \pm 0,8	31,6 \pm 3,3	30,4 \pm 2,1	30,3 \pm 3,2
% de Inhibición por SRIF de la actividad AC estimulada por FK	30,8 \pm 2,3	29,3 \pm 7,0	32,2 \pm 1,6	27,9 \pm 1,1**

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.

Otro componente principal de la vía de señalización de la SRIF son las proteínas Gi, que interaccionan con los receptores de SRIF, para transducir la señal del receptor al efector AC. Por lo tanto, se analizaron los niveles proteicos de las subunidades α i1, α i2 y α i3 de las proteínas Gi mediante inmunodetección con el fin de averiguar si podrían estar modificados por la administración del A β (25-35) en membranas de hipocampo. Este parámetro se estudió en el grupo de ratas tratadas con una sola dosis del A β (25-35) (10 μ g) y sacrificadas a los 14 días de la infusión puesto que a los 7 días de su administración, no se observaron cambios significativos ni en el número de receptores de SRIF ni en la actividad AC. Los resultados obtenidos revelaron que la administración aguda del A β (25-35) (10 μ g) no modificó los niveles proteicos de α i1, α i2 o α i3 a los 14 días, con respecto al grupo control (Figura 16).

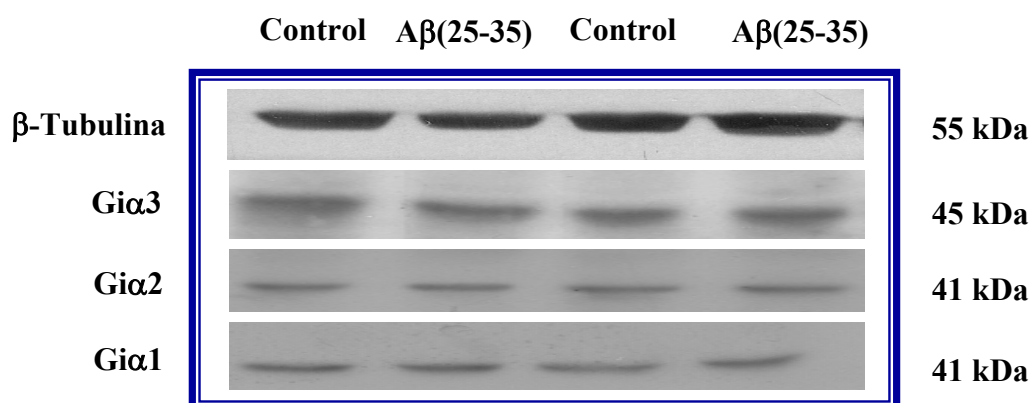


Figura 16. Autorradiografías derivadas de la inmunodetección de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de las proteínas Gi en membranas de hipocampo de ratas control ($n=5$) y ratas tratadas con una sola dosis del A β (25-35) (10 μ g) a los 14 días de la administración ($n=5$). La figura mostrada es representativa de cinco ensayos realizados. Se empleó el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina como control de carga. Estadísticamente, no hay diferencias significativas en comparación con el grupo control.

1. 2. Modelo crónico

La infusión continua del A β (25-35) (300 pmol/día) durante 14 días provocó una disminución de aproximadamente un 20% en el contenido de SRIF-IR en el hipocampo de la rata, con respecto al grupo control (Figura 17).

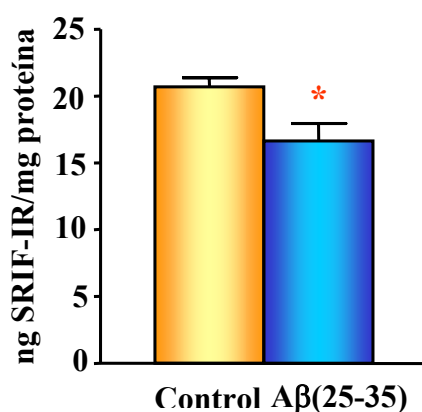


Figura 17. Efecto de una infusión i.c.v. crónica del A β (25-35) (300 pmol/día) sobre el contenido de somatostatina inmunorreactiva (SRIF-IR) en el hipocampo de la rata. Los valores se expresan como la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo mediante análisis de la varianza (ANOVA) y el test de Student de Newman-Keuls. La significatividad estadística frente al control: * $P < 0,05$.

Está bien establecido que en el promotor del gen de la SRIF existe un elemento de respuesta a AMPc, denominado CRE, al que se une la proteína p-CREB, que actúa como factor de transcripción, regulando la expresión de dicho gen. Por ello, se planteó analizar el grado de expresión proteica de la proteína p-CREB, con objeto de evaluar si la administración crónica del

A β (25-35) podría estar modificando la tasa de transcripción del gen de la SRIF en el hipocampo de la rata. Los ensayos de inmunodetección revelaron que la infusión crónica del A β (25-35) (300 pmol/día) provoca una disminución de los niveles proteicos de p-CREB en el hipocampo de la rata (Figura 18).

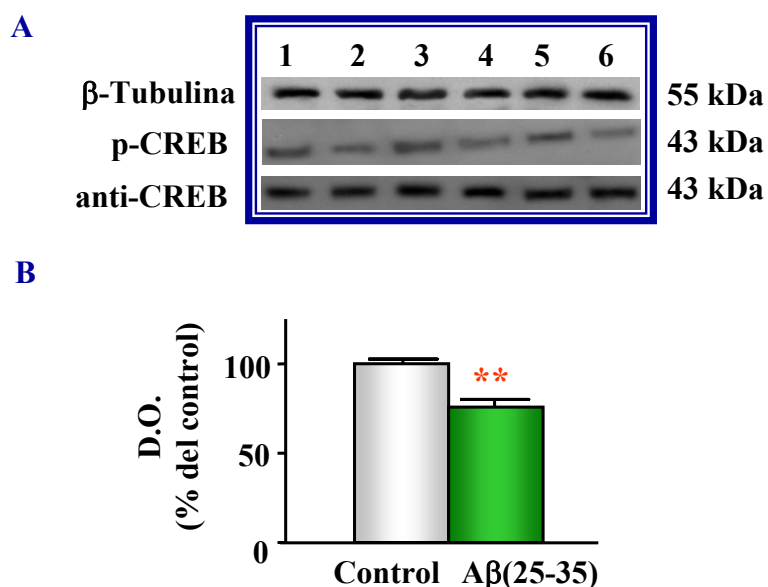


Figura 18. Panel A: Autorradiografías derivadas de la inmunodetección de la proteína de unión a CRE fosforilada (p-CREB) y CREB total en homogenados de hipocampo de la rata. Los carriles 1, 3 y 5 corresponden a ratas control (n=5) y los carriles 2, 4 y 6 a ratas tratadas con el A β (25-35) (300 pmol/día) (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Como control de carga se empleó el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina. **Panel B: Análisis densitométrico de los niveles de p-CREB en el hipocampo de ratas control y ratas tratadas con el A β (25-35).** Estos resultados fueron normalizados con los niveles de la proteína CREB-total. Los datos representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: **P<0,01.

En los ensayos de unión, se establece una competición entre el trazador 125 I-Tyr 11 -SRIF-14 y la SRIF por la unión a los receptores de SRIF presentes en la membrana. Por lo tanto, se analizó si esta unión podría verse modificada por el tratamiento con el A β (25-35) (300 pmol/día). Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento con el A β (25-35) durante 14 días no modificó la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de hipocampo. Asimismo, la constante de disociación, que refleja la afinidad del receptor por la SRIF, tampoco se vio modificada por este tratamiento, en comparación con el grupo control. (Tabla 9).



Tabla 9. Efecto de la infusión i.c.v. continua del A β (25-35) (300 pmol/día) durante 14 días sobre los parámetros de equilibrio de la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de hipocampo de la rata.

Grupos	Receptores de SRIF	
	Bmax	Kd
Control	523 \pm 22	0,51 \pm 0,03
Aβ(25-35) (14 días)	492 \pm 27	0,50 \pm 0,05

Los parámetros de unión se calcularon a partir del análisis de Scatchard por regresión lineal. Las unidades para la Kd son nM y para la Bmax femtomoles de SRIF unida por mg de proteína. Los valores se expresan como la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. Estadísticamente, no hay diferencias significativas en comparación con el grupo control.

Diversos autores han puesto de manifiesto, mediante técnicas de clonación, la existencia de cinco subtipos de receptores de SRIF (sst1-sst5) en membranas de células animales (Bruno y col., 1992; Yamada y col., 1992; O'Carroll y col., 1992). Dado que el análogo de SRIF utilizado en los ensayos de unión se une con similar afinidad a los cinco subtipos de receptores, se planteó averiguar si la administración continua del A β (25-35) (300 pmol/día) podría alterar la expresión proteica de los subtipos sst1, sst2, sst3 o sst4. Los ensayos de inmunodetección revelaron que dicho tratamiento no modifica los niveles proteicos de ningún subtipo de receptor de SRIF en membranas de hipocampo de rata, con respecto al grupo control (Figura 19).

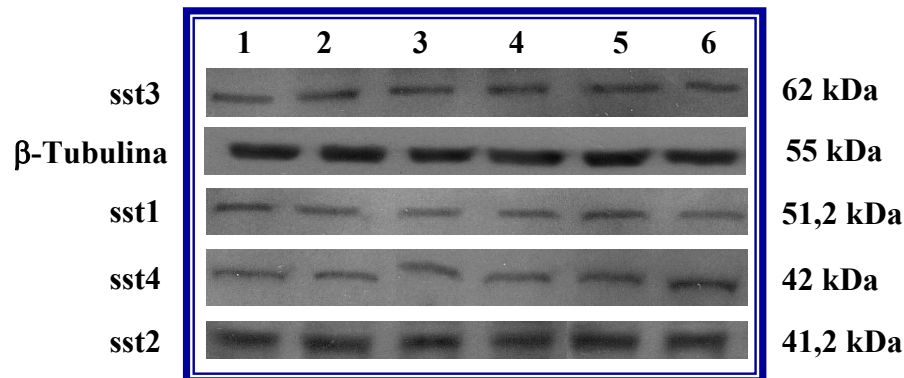


Figura 19. Autorradiografías derivadas de la inmunodetección de los receptores de SRIF (sst1-sst4) en membranas de hipocampo de la rata. Los carriles 1, 3 y 5 corresponden a ratas control (n=5) y los carriles 2, 4 y 6 a ratas tratadas con el A β (25-35) (300 pmol/día) (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Se empleó el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina como control de carga.

Como se ha expuesto anteriormente, los cinco receptores de se acoplan de manera inhibitoria a la enzima AC. Por ello, se analizó la actividad de dicha enzima en condiciones basales y estimuladas por FK así como la capacidad de la SRIF para inhibir la actividad enzimática AC en membranas de hipocampo de ratas control y ratas tratadas con el A β (25-35) durante 14 días. Así, se observó que la administración crónica del A β (25-35) (300 pmol/día) provocó una disminución de la actividad enzimática tanto en condiciones basales como estimuladas por FK. Asimismo, la capacidad de la SRIF para inhibir la actividad AC estimulada por FK era significativamente menor en ratas tratadas crónicamente con el A β (25-35) (300 pmol/día), en comparación con el grupo control (Figura 20).

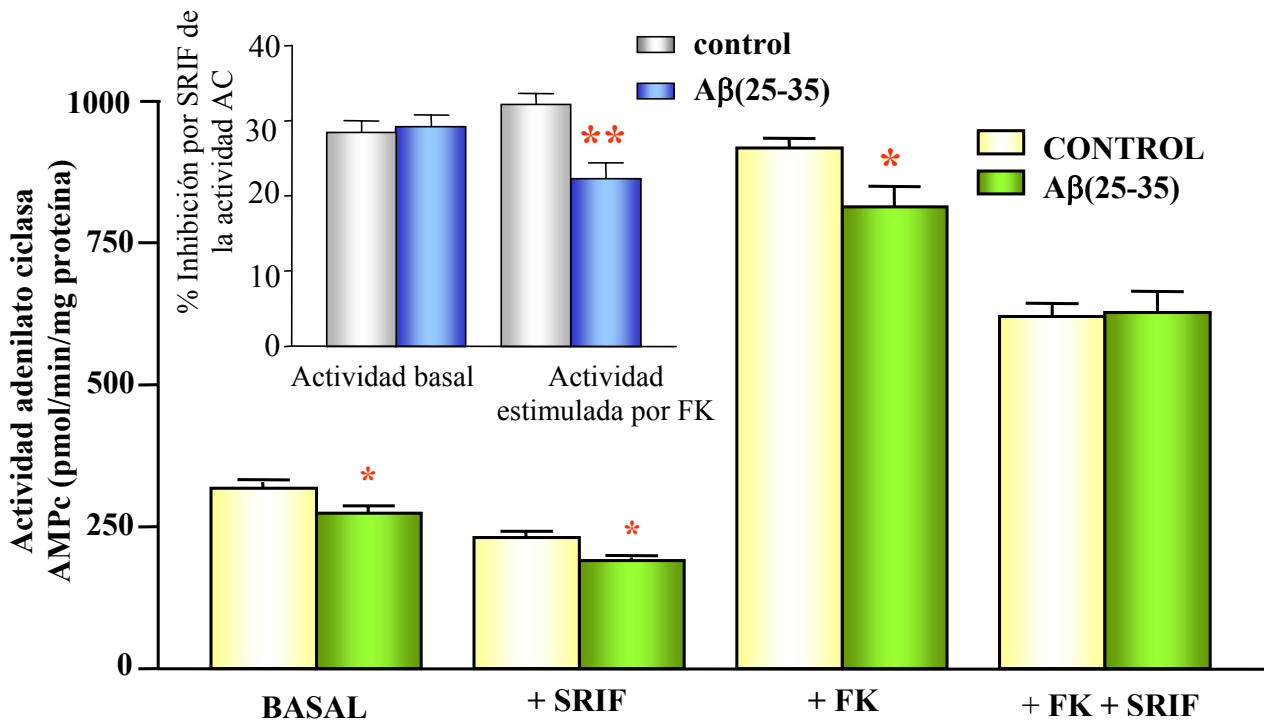


Figura 20. Efecto de la infusión i.c.v. crónica del Aβ(25-35) (300 pmol/día) durante 14 días sobre la actividad adenilato ciclasa (AC) en condiciones basales y estimuladas por forskolina (FK), así como la inhibición de dichas actividades por somatostatina (SRIF) en membranas de hipocampo de la rata. Las membranas se incubaron con o sin SRIF (10^{-4} M) en ausencia (actividad basal) o presencia de FK (10^{-5} M). Los diagramas de barras representan la media \pm E.S.M. de cinco ratas. Cada experimento se realizó por duplicado. Comparación estadística frente al control: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Gráfica insertada: porcentaje de inhibición mediado por SRIF de la actividad AC.

En vista de estos resultados, se planteó la hipótesis de que la reducción de la actividad enzimática AC observada después de la administración crónica del Aβ(25-35) (300 pmol/día) podría deberse a una disminución en la expresión de la enzima AC. Para evaluar esta hipótesis se analizaron los niveles proteicos de las isoformas I, V, VI y VIII de la enzima AC mediante inmunodetección. Se analizaron las isoformas AC V y AC VI puesto que los receptores de SRIF están acoplados negativamente a la AC a través de las subunidades $\alpha i1$, $\alpha i2$ y $\alpha i3$ de las proteínas Gi, las cuales inhiben selectivamente estas isoformas de AC. Por otro lado, se analizaron las isoformas AC I y AC VIII, puesto que son las que se expresan mayoritariamente en cerebro (Sunahara y Taussig, 2002). Los ensayos de inmunodetección revelaron un notable aumento de los niveles proteicos de las isoformas AC V/VI y una disminución significativa de la isoforma AC I, en el grupo de ratas tratadas con la infusión crónica del Aβ(25-35) (300 pmol/día), con respecto al grupo control. Sin embargo, el tratamiento con el Aβ(25-35) no alteró los niveles proteicos de la isoforma AC VIII (Figura 21).

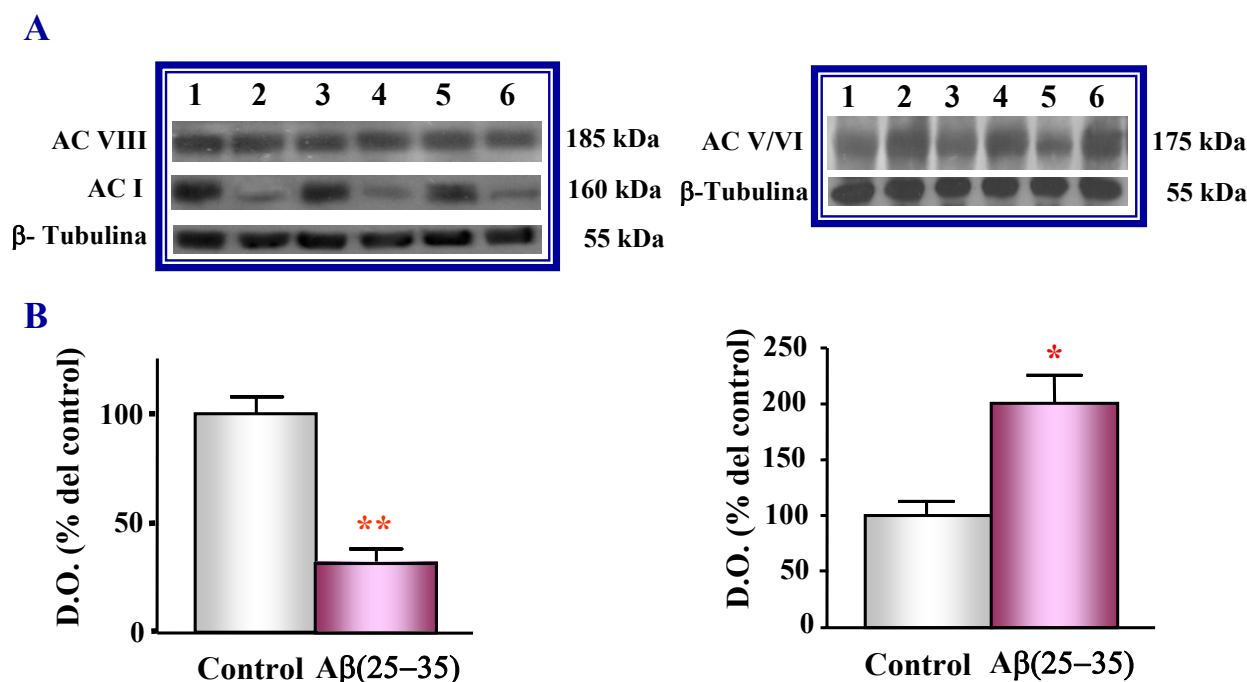


Figura 21. Panel A: Efecto de la infusión i.c.v. continua del A β (25-35) (300 pmol/día) durante 14 días sobre los niveles proteicos de las isoformas I, V/VI y VIII de la enzima adenilato ciclasa (AC) en el hipocampo de la rata. Los carriles 1, 3 y 5 corresponden a ratas control y los carriles 2, 4 y 6 a ratas tratadas con A β (25-35). La figura mostrada es representativa de otros cinco ensayos. La β -tubulina se utilizó como control de carga. **Panel B:** Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de la inmunodetección de las isoformas AC I (panel izquierdo) y AC V/VI (panel derecho) de la enzima AC en membranas de hipocampo de ratas control y ratas tratadas con el A β (25-35). Se le asignó un valor arbitrario de 100 a las densidades ópticas de las bandas correspondientes al grupo control. La densidad óptica de las bandas correspondientes al grupo de ratas tratadas con A β (25-35) se representa como un porcentaje del control. Los datos representan la media \pm E.S.M. de cinco ratas. Significatividad estadística frente al control: * P<0,05; **P<0,01.

La inhibición de la enzima AC se produce a través de las subunidades α_i (α_i1 , α_i2 y α_i3) de las proteínas G_i que interaccionan con los receptores de SRIF. Por lo tanto se evaluaron, mediante inmunodetección, los niveles proteicos de dichas subunidades con objeto de determinar si podrían estar alterados por el tratamiento con el A β (25-35). Los resultados revelaron que la infusión crónica del A β (25-35) (300 pmol/día) no modifica significativamente los niveles proteicos de dichas subunidades en membranas de hipocampo de rata en comparación con el grupo control (Figura 22).

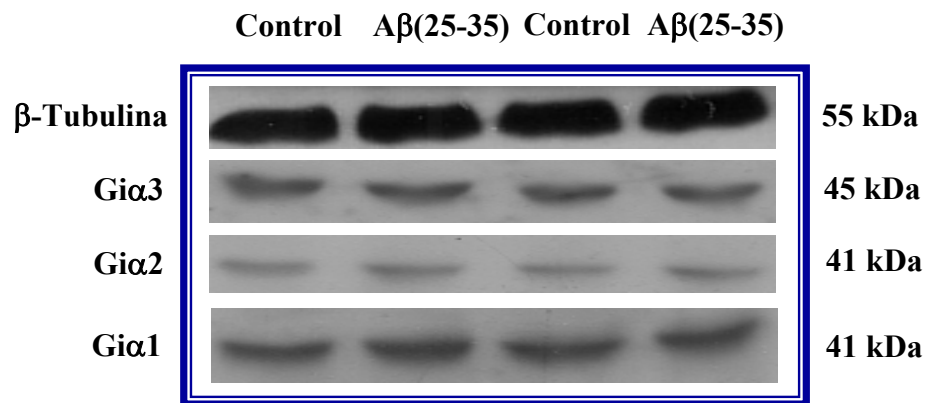


Figura 22. Autorradiografías derivadas de la inmunodetección de las subunidades α 1, α 2 y α 3 de las proteínas Gi en membranas de hipocampo de ratas control (n=5) y ratas tratadas con el A β (25-35) (300 pmol/día) durante 14 días (n=5). La figura mostrada es representativa de cinco ensayos realizados. Se empleó el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina como control de carga. Estadísticamente no hay diferencias significativas en comparación con el grupo control.



2. CORTEZA FRONTOPARIETAL

En base a los resultados observados en el hipocampo de ratas tratadas con el A β (25-35), quisimos averiguar si dichos efectos eran específicos o no del área cerebral. Por ello, se realizó a continuación un estudio de los efectos del A β (25-35) en la corteza frontoparietal de la rata.

2. 1. Modelo agudo

La administración de una única dosis i.c.v. del A β (25-35) (10 μ g) no modificó ni el número ni la afinidad de los receptores de SRIF a los 7 días de la administración. Sin embargo, a los 14 días de su inyección, el A β (25-35) indujo una disminución significativa del número de receptores de SRIF, así como un aumento de la afinidad de los mismos en la corteza frontoparietal de la rata (Tabla 10, Figura 23).

Tabla 10. Efecto de una sola dosis del A β (25-35) (10 μ g) a los 7 o 14 días de su administración sobre los parámetros de equilibrio de la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de corteza frontoparietal de la rata.

<u>Grupos</u>	<u>Receptores de SRIF</u>			
	<u>7 días</u>		<u>14 días</u>	
	<u>Bmax</u>	<u>Kd</u>	<u>Bmax</u>	<u>Kd</u>
Control	591 \pm 37	0,67 \pm 0,06	523 \pm 27	0,59 \pm 0,03
Aβ(25-35)	583 \pm 35	0,62 \pm 0,06	380 \pm 26**	0,40 \pm 0,03**

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 SRIF 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<0,01.

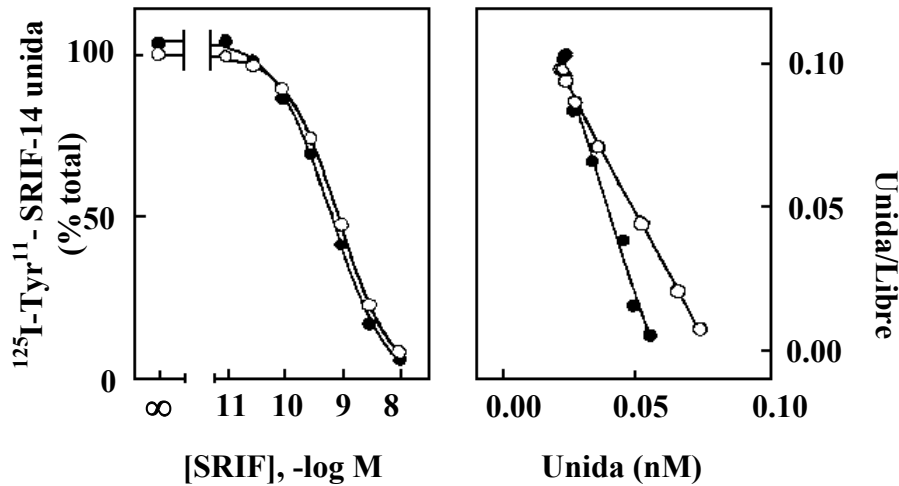


Figura 23. Efecto de una sola dosis del $\text{A}\beta(25-35)$ ($10 \mu\text{g}$) a los 14 días de su administración, sobre la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de corteza frontoparietal de la rata. **Panel izquierdo:** Inhibición competitiva de la unión de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$ a membranas de corteza frontoparietal de rata por la SRIF fría. Las membranas se incubaron durante 60 min a 30°C en presencia de 250 pM de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$ y concentraciones crecientes del péptido nativo. Los puntos corresponden a ratas control (O ; $n=5$) y ratas tratadas con el $\text{A}\beta(25-35)$ ($10 \mu\text{g}$) (\bullet ; $n=5$). 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 están incluidos en la [Tabla 10](#).

Puesto que los receptores de SRIF están acoplados negativamente a la enzima AC, se examinó la actividad de dicha enzima en condiciones basales y estimuladas por FK, así como la inhibición por SRIF de dichas actividades enzimáticas en membranas de corteza frontoparietal de ratas control y ratas tratadas con el $\text{A}\beta(25-35)$ ($10 \mu\text{g}$). A los 7 días de la administración del $\text{A}\beta(25-35)$, no se detectaron cambios significativos ni en la actividad basal ni en la actividad estimulada por FK de la enzima AC, además la FK estimuló la actividad AC basal en una proporción similar en todos los grupos experimentales. Tampoco se detectaron alteraciones en la capacidad de la SRIF para inhibir ambas actividades en membranas de corteza frontoparietal. Sin embargo a los 14 días de su administración aguda, la capacidad de la SRIF para inhibir la actividad AC basal y estimulada por FK fue significativamente menor en el grupo de ratas tratadas con el $\text{A}\beta(25-35)$ en comparación con el grupo control ([Tabla 11](#)).



Tabla 11. Actividad adenilato ciclasa (AC) (pmol AMPc/min/mg proteína) en presencia o ausencia de forskolina (FK) (10^{-5} M) o somatostatina (SRIF) (10^{-4} M) en membranas de corteza frontoparietal de ratas control (n=5) y ratas tratadas con una sola dosis del A β (25-35) (10 μ g) (n=5) a los 7 o 14 días de su administración.

Actividad adenilato ciclasa (pmol AMPc/min/mg proteína)				
	7 días		14 días	
	<u>Control</u>	<u>Aβ(25-35)</u>	<u>Control</u>	<u>Aβ(25-35)</u>
Actividad basal	328 \pm 11	298 \pm 14	415 \pm 29	372 \pm 19
+10 ⁻⁴ M SRIF	228 \pm 20	198 \pm 9	269 \pm 18	263 \pm 17
+10 ⁻⁵ M FK	1229 \pm 89	1242 \pm 66	1949 \pm 60	1658 \pm 92
+10 ⁻⁵ M FK+ 10 ⁻⁴ M SRIF	869 \pm 53	856 \pm 39	1298 \pm 68	1358 \pm 91
Veces de estimulación	3,8 \pm 0,1	4,2 \pm 0,3	4,4 \pm 0,5	4,4 \pm 0,3
% de Inhibición por SRIF de la actividad AC basal	30 \pm 3	33 \pm 3	37 \pm 2	29 \pm 1*
% de Inhibición por SRIF de la actividad AC estimulada por FK	31 \pm 4	32 \pm 1	33 \pm 4	18 \pm 1**

Los resultados 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.

Dado que los receptores de SRIF se acoplan a las proteínas Gi, inhibiendo así la vía de la AC, se examinaron los niveles proteicos de las subunidades α 1, α 2 y α 3 de las proteínas Gi mediante inmunodetección, con el fin de averiguar si la administración de una sola dosis del A β (25-35) podría alterar dichos niveles. Se realizó el análisis sólo a los 14 días de la administración del A β (25-35), ya que a los 7 días de la administración, no se detectaron cambios significativos ni en el número de receptores de SRIF ni en la actividad de la AC. Los niveles de Gi α 1, Gi α 2 y Gi α 3 en membranas de corteza frontoparietal no se vieron modificados por el tratamiento con una sola dosis del A β (25-35) a los 14 días de su administración (Figura 24).

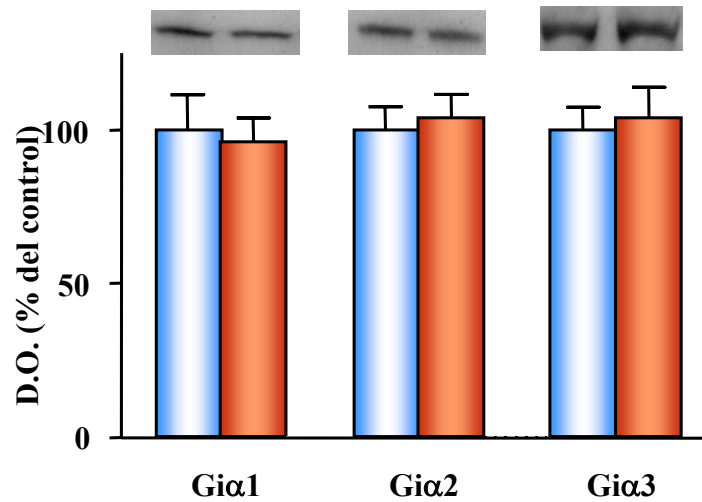


Figura 24. Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de la inmunodetección de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de las proteínas Gi en membranas de corteza frontoparietal de ratas control (■) y de ratas tratadas con una sola dosis del A β (25-35) (10 μ g) (■). Se les asignó un valor arbitrario de 100 a las densidades ópticas correspondientes al grupo control. La densidad óptica de las bandas correspondientes al grupo de ratas tratadas con el A β (25-35) se representa como un porcentaje del control. Los datos representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes. Estadísticamente, no hay diferencias significativas en comparación con los grupos control.

2. 2. Modelo crónico

Los cambios neurodegenerativos detectados en la EA son causados por un depósito continuo del A β a nivel del cerebro. Por lo tanto se planteó, a continuación, examinar detalladamente los efectos de una infusión i.c.v. continua del A β (25-35) (300 pmol/día) durante 14 días. Esta infusión crónica indujo una disminución notable del número de receptores de SRIF en membranas de corteza frontoparietal similar a la observada a los 14 días de la administración aguda del A β (25-35) (10 μ g) (Tabla 12). No se observaron cambios en la afinidad de dichos receptores, tras la infusión crónica del péptido.



Tabla 12. Efecto de una única dosis del A β (25-35) (10 μ g) a los 14 días de su administración y de una infusión i.c.v. continua del A β (25-35) (300 pmol/día) durante 14 días sobre los parámetros de equilibrio de la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de corteza frontoparietal de la rata.

Grupos	Receptores de SRIF			
	Infusión aguda		Infusión crónica	
	<u>Bmax</u>	<u>Kd</u>	<u>Bmax</u>	<u>Kd</u>
Control	523 \pm 27	0,59 \pm 0,03	535 \pm 21	0,56 \pm 0,02
Aβ(25-35)	380 \pm 26 **	0,40 \pm 0,03**	398 \pm 13**	0,51 \pm 0,05

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 SRIF 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<0,01.

Con el fin de profundizar en el conocimiento de los efectos observados en esta área cerebral, se planteó analizar los parámetros que caracterizan al sistema somatostatinérgico en corteza frontal y en corteza parietal por separado, de ratas tratadas durante 14 días con el A β (25-35). El tratamiento crónico con el A β (25-35) indujo una disminución significativa del número de receptores de SRIF tanto en la corteza frontal como en la corteza parietal de rata (Figura 25; Tabla 13), sin alterar su constante de disociación.

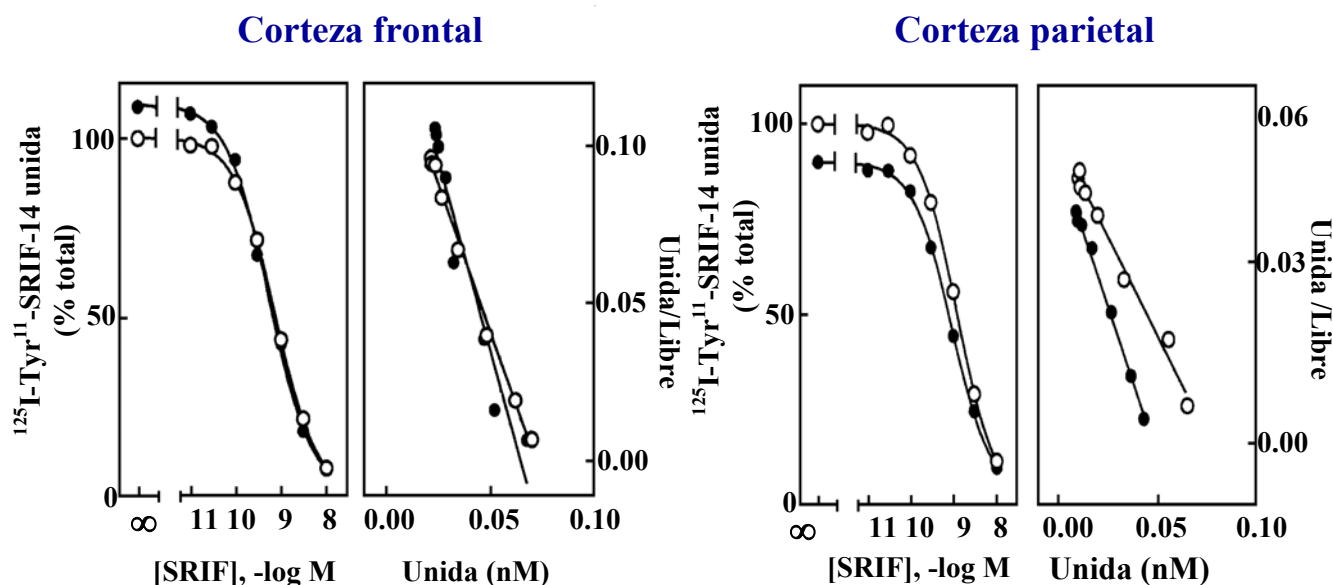


Figura 25. Efecto de una infusión i.c.v. continua del Aβ(25-35) (300 pmol/día) durante 14 días sobre la unión de la SRIF a membranas de corteza frontal y corteza parietal de la rata. Paneles izquierdos: Inhibición competitiva de la unión de ¹²⁵I-Tyr¹¹-SRIF-14 a membranas de corteza frontal o parietal de rata por la SRIF fría. Las membranas se incubaron durante 60 min a 30°C en presencia de 250 pM de ¹²⁵I-Tyr¹¹-SRIF-14 y concentraciones crecientes del péptido nativo. Los puntos corresponden a ratas control (○; n=5) y ratas tratadas con el Aβ(25-35) (●; n=5). Cada punto representa la media ± E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. Paneles derechos: Análisis de Scatchard de los datos de unión. Los correspondientes parámetros de equilibrio están incluidos en la Tabla 13.

Tabla 13. Efecto de la infusión i.c.v. continua del Aβ(25-35) (300 pmol/día) durante 14 días sobre los parámetros de equilibrio de la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de corteza frontal y corteza parietal de la rata.

Grupos	Receptores de SRIF			
	Corteza frontal		Corteza parietal	
	Bmax	Kd	Bmax	Kd
Control	512±33	0,55±0,1	539±61	0,60±0,01
Aβ(25-35)	431±21 *	0,43±0,06	393±11 *	0,50±0,01

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 SRIF 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.



A continuación, se evaluó si el tratamiento crónico con el A β (25-35) (300 pmol/día) podría alterar la actividad de la enzima AC, en condiciones basales y estimulas por FK, así como la capacidad de la SRIF para inhibir dicha actividad en membranas de corteza frontal o corteza parietal de rata. En corteza frontal, se observó una disminución en la capacidad de la SRIF para inhibir la actividad AC estimulada por FK. Asimismo, en la corteza parietal, se detectó una disminución tanto de la actividad AC basal como de la capacidad de la SRIF para inhibir la actividad AC basal y estimulada por FK (Tabla 14).

Tabla 14. Efecto de la infusión i.c.v. continua del A β (25-35) (300 pmol/día) durante 14 días sobre la actividad adenilato ciclasa (AC) basal y estimulada por forskolina (FK) en membranas procedentes de corteza frontal y corteza parietal de la rata. Las membranas procedentes de ratas control (n=5) y ratas tratadas con el A β (25-35) (n=5) se incubaron con o sin SRIF (10⁻⁴M) en ausencia o presencia de FK (10⁻⁵M).

Actividad adenilato ciclasa (pmol AMPc/min/mg proteína)				
	Corteza frontal		Corteza parietal	
	Control	A β (25-35)	Control	A β (25-35)
Actividad basal	241±15	248±42	394±11	319±19**
+10 ⁻⁴ M SRIF	172±10	163±34	255±13	226±13
+10 ⁻⁵ M FK	678±50	691±17	1199±128	1100±109
+10 ⁻⁵ M FK + 10 ⁻⁴ M SRIF	393±24	473±146	780±91	773±83
Veces de estimulación	2,8±0,1	3±0,3	3,2±0,4	3,6±0,2
% de Inhibición por SRIF de la actividad AC basal	28,5±0,9	31,1±0,8	36,9±1,2	31,6±1,3*
% de Inhibición por SRIF de la actividad AC estimulada por FK	41,9±1,1	30,0±3,7*	35,6±1,4	28,1±0,7**

Los valores representan la media de cinco experimentos individuales realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: *P<0,05; **P<0,01.

Mediante inmunodetección se examinaron los niveles proteicos de las subunidades α i1, α i2 y α i3 de las proteínas Gi en membranas de corteza frontal o corteza parietal de ratas tratadas

crónicamente con el A β (25-35) (300 pmol/día), observando que dicho tratamiento no altera el grado de expresión de dichas (Figura 26).

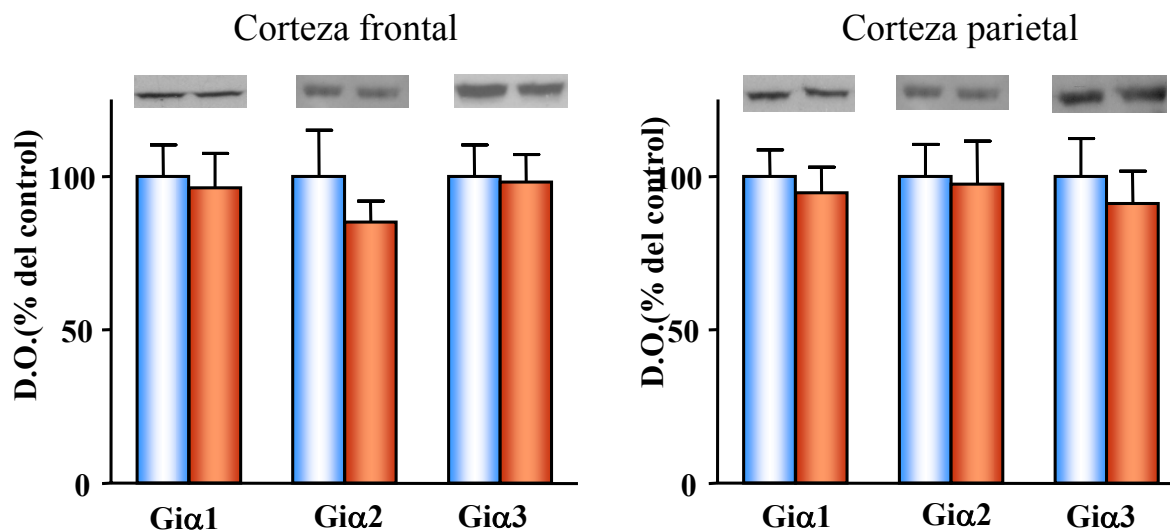


Figura 26. Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de la inmunodetección de las subunidades α 1, α 2 y α 3 de las proteínas Gi en membranas de corteza frontal y corteza parietal de ratas control (■) y de ratas tratadas con el A β (25-35) (300 pmol/día) (■) durante 14 días. Se les asignó un valor arbitrario de 100 a las densidades ópticas correspondientes al grupo control. La densidad óptica de las bandas correspondientes al grupo de ratas tratadas con el A β (25-35) se representa como un porcentaje del control. Los datos representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes. Estadísticamente, no hay diferencias significativas en comparación con los grupos control.

Por otro lado, este tratamiento crónico con el A β (25-35) causó una disminución significativa de los niveles de SRIF-IR tanto en la corteza frontal como en la corteza parietal de la rata. (Tabla 15).

Tabla 15. Efecto de la infusión i.c.v. continua del A β (25-35) durante 14 días sobre el contenido de SRIF-inmuno-reactiva (SRIF-IR) en corteza frontal y corteza parietal de la rata.

Grupos	SRIF-IR (ng/ mg proteína)	
	Corteza frontal	Corteza parietal
Control	13,8 \pm 0,3	12,1 \pm 0,4
A β (25-35)	8,4 \pm 0,1***	9,6 \pm 0,1***

Los valores se expresan como la media \pm E.S.M. de cinco experimentos por duplicado. Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo mediante análisis de la varianza (ANOVA) y el test de Student de Newman-Keuls. Significatividad estadística frente al control: ***P<0,001.



3. EFECTO DEL A β (35-25) SOBRE EL SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO EN EL HIPOCAMPO Y CORTEZA CEREBRAL DE RATA

Para comprobar que los cambios anteriormente descritos tanto en el hipocampo como en la corteza cerebral de rata son producidos específicamente por el A β (25-35), se analizó el efecto del A β (35-25), secuencia inversa de la región activa del A β (25-35), sobre la unión de la ¹²⁵I-Tyr¹¹-SRIF-14 a sus receptores de membrana. En la corteza frontoparietal, se observó que la administración de una sola dosis del A β (35-25) (10 μ g) no ejerció ningún efecto sobre los parámetros de unión de la SRIF, a los 14 días de la administración (Tabla 16). Asimismo, la administración i.c.v. continua del A β (35-25) durante 14 días no modificó los parámetros de unión de la SRIF a sus receptores ni en el hipocampo, ni en la corteza frontal, ni tampoco en la corteza parietal de rata (Tabla 17).

Tabla 16. Efecto de una sola dosis del A β (35-25) (10 μ g) a los 14 días de su administración, sobre los parámetros de equilibrio de la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de corteza frontoparietal de la rata.

<u>Grupos</u>	<u>Receptores de SRIF</u>	
	<u>Bmax</u>	<u>Kd</u>
Control	522 \pm 8	0,58 \pm 0,05
Aβ(35-25) (14 días)	503 \pm 8	0,53 \pm 0,04

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 SRIF unida por mg de proteína. Los valores se expresan como la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. Estadísticamente, no hay diferencias significativas en comparación con el grupo control.



Tabla 17. Efecto de la infusión i.c.v. continua del A β (35-25) (300 pmol/día) durante 14 días sobre los parámetros de equilibrio de la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de hipocampo, corteza frontal y corteza parietal de la rata.

<u>Grupos</u>	<u>Receptores de SRIF</u>					
	<u>Hipocampo</u>		<u>Corteza frontal</u>		<u>Corteza parietal</u>	
	<u>Bmax</u>	<u>Kd</u>	<u>Bmax</u>	<u>Kd</u>	<u>Bmax</u>	<u>Kd</u>
Control	523 \pm 22	0,51 \pm 0,03	482 \pm 25	0,62 \pm 0,03	452 \pm 28	0,58 \pm 0,03
Aβ(35-25)	476 \pm 34	0,46 \pm 0,02	466 \pm 24	0,64 \pm 0,04	508 \pm 20	0,58 \pm 0,01

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 SRIF unida por mg de proteína. Los valores se expresan como la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. Estadísticamente, no hay diferencias significativas en comparación con el grupo control.



4. EFECTO DE LA INFUSIÓN CRÓNICA DEL A β (25-35) Y DEL TRATAMIENTO CON MINOCICLINA SOBRE EL SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO EN LA CORTEZA TEMPORAL DE LA RATA

Los resultados anteriormente obtenidos demuestran que las alteraciones de la vía de señalización de la SRIF en las áreas cerebrales estudiadas son más pronunciadas después de la administración crónica del A β (25-35) que después de la infusión aguda. Por ello, elegimos emplear este modelo crónico en la corteza temporal de la rata para profundizar en el efecto de dicho péptido sobre el sistema somatostatinérgico en otra área del sistema SNC. Asimismo, analizamos el posible efecto terapéutico de la minociclina sobre las alteraciones de este sistema de neurotransmisión.

4. 1. Efecto de la administración del A β (25-35) y de la minociclina sobre la expresión de la somatostatina

Se utilizó la infusión i.c.v. continua del A β (25-35) durante 14 días para reproducir parcialmente la EA en la rata. Esta infusión provocó una disminución, de aproximadamente un 60%, en los niveles de SRIF-IR en la corteza temporal de la rata en comparación con el grupo control, mientras que la administración de minociclina aumentó dicho parámetro. Sin embargo, el pretratamiento de las ratas con minociclina previno la disminución inducida por el A β (25-35) (Figura 27).

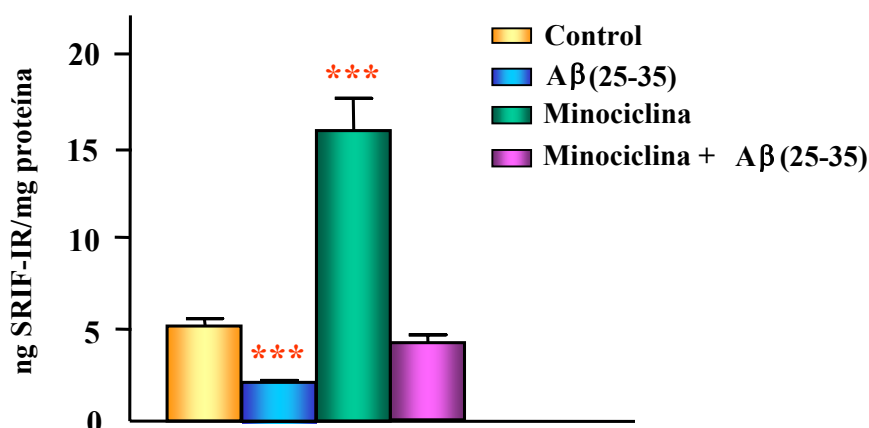


Figura 27. Efectos de la infusión i.c.v. continua del A β (25-35), de la administración de minociclina y de la coadministración de minociclina más el A β (25-35) sobre los niveles de somatostatina inmunorreactiva (SRIF-IR) en la corteza temporal de la rata. Los valores se expresan como la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: ***P<0,001.

Dado que el gen de la SRIF presenta en su región promotora un elemento CRE, nos planteamos si las alteraciones en los niveles de SRIF podrían atribuirse a un aumento o disminución en la expresión del gen. Para evaluar esta posibilidad, se midieron los niveles de la proteína p-CREB, que al unirse a CRE estimula la transcripción génica. Los ensayos de inmunodetección revelaron que la administración de minociclina induce un aumento en los niveles de p-CREB en la corteza temporal de la rata mientras que la administración i.c.v. crónica del A β (25-35) provoca una disminución significativa en los niveles de dicha proteína (Figura 28).

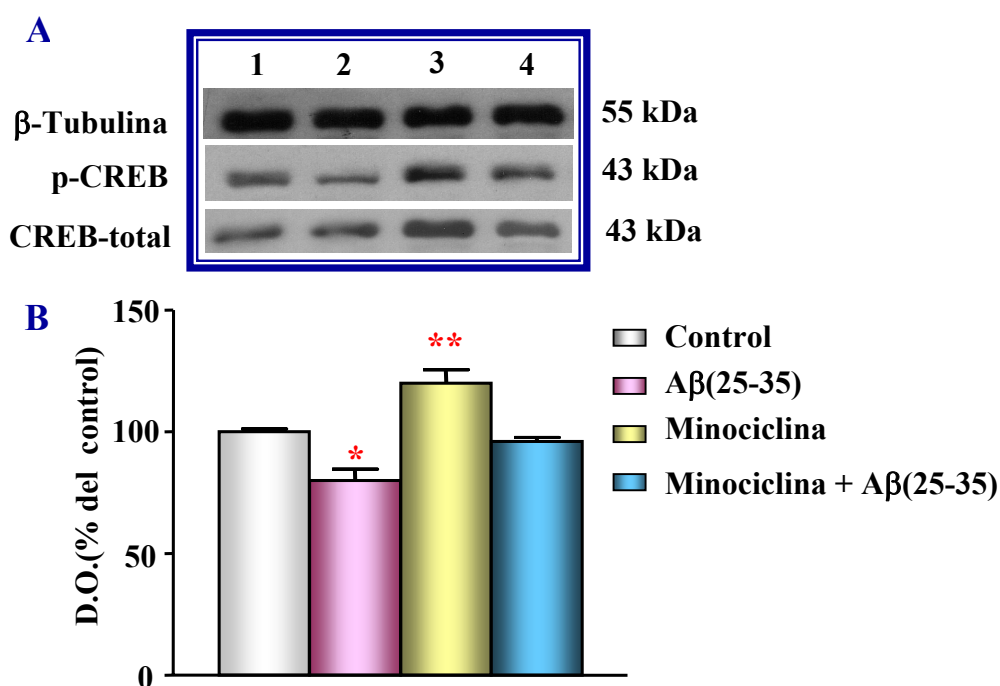


Figura 28. **Panel A:** Autorradiografías derivadas de la inmunodetección de la proteína de unión a CRE fosforilada (p-CREB) y CREB total en homogenados de corteza temporal de la rata. El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con el A β (25-35) (n=5), el carril 3 a ratas tratadas con minociclina (n=5) y el carril 4 a ratas tratadas con minociclina más el A β (25-35) (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Como control de carga se empleó el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina. **Panel B:** Análisis densitométrico de los niveles de p-CREB en la corteza temporal de ratas control y ratas tratadas con el A β (25-35), con minociclina o con minociclina más el A β (25-35). Estos resultados fueron normalizados con los niveles de la proteína CREB-total. Los datos representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: *P<0,05; **P<0,01.

Por otro lado, con el fin de profundizar en el efecto del A β y de la minociclina, se analizaron los niveles del ARNm de la SRIF mediante RT-PCR. Como se observa en la figura 29, el A β (25-35) induce un descenso significativo en los niveles del ARNm de la SRIF en la corteza temporal de



la rata. Sin embargo, en la corteza temporal de las ratas tratadas previamente con minociclina dichos niveles fueron similares a los valores control.

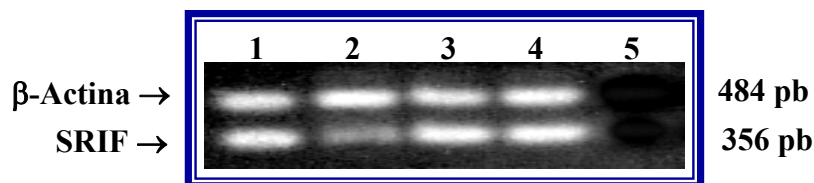


Figura 29. Niveles de ARNm de la SRIF en la corteza temporal de la rata, detectados mediante RT-PCR. El ARN total aislado de la corteza temporal de ratas control (carril 1), ratas tratadas con el A β (25-35) (carril 2), con minociclina (carril 3) o con minociclina más el A β (25-35) (carril 4) fue sometido a RT-PCR con primers específicos para la SRIF y la β -actina. El carril 5 representa el control de contaminación sin ADNc, para lo cual las muestras fueron procesadas de la misma manera pero sin ser sometidas a la transcripción inversa. Los productos resultantes se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa (con gradiente de densidad 2%-1,5%-1%) y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

4. 2. Efecto de la administración del A β (25-35) y de la minociclina sobre los niveles proteicos de neprilisina

Un estudio reciente ha revelado que el A β es degradado mayoritariamente por la enzima neprilisina, una metalopeptidasa de membrana (Takaki y col., 2000). Además, se ha observado que la SRIF es capaz de regular la actividad de esta enzima en neuronas, actuando sobre su nivel de expresión y localización sináptica (Saito y col., 2005). Por lo tanto, dado que el A β (25-35) provoca un descenso de los niveles de SRIF-IR en la corteza temporal de la rata y que la administración de minociclina induce un aumento de dichos niveles, el siguiente paso consistió en evaluar si estos tratamientos podrían modificar los niveles proteicos de neprilisina. Los resultados de la inmunodetección mostraron que el tratamiento con el A β (25-35) provoca una disminución en los niveles proteicos de neprilisina en la corteza temporal de la rata mientras que la administración de minociclina ejerce el efecto contrario (Figura 30).

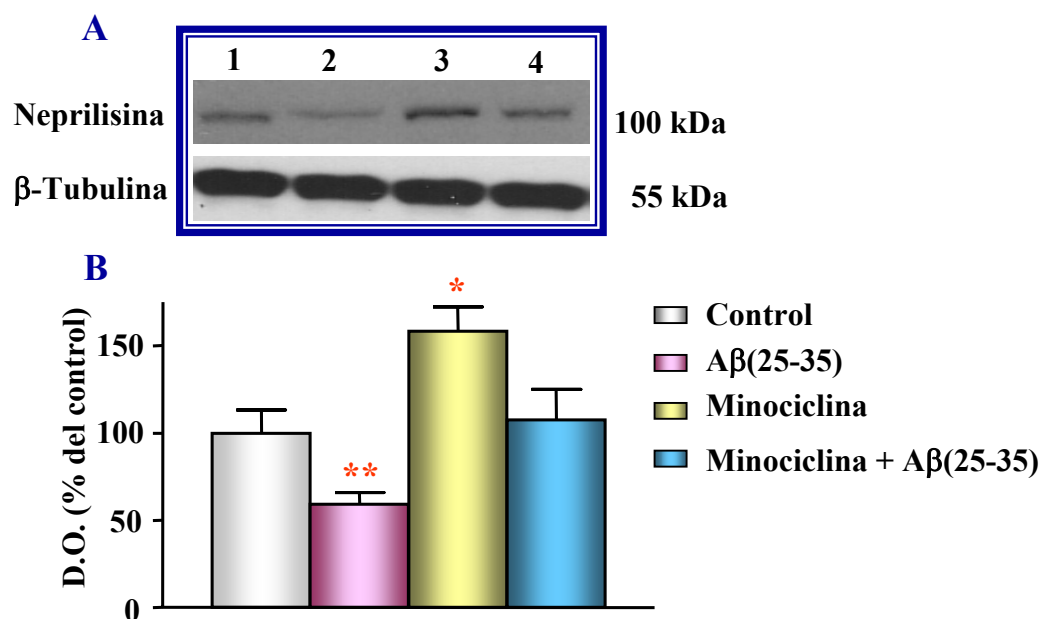


Figura 30. Panel A: Autorradiografías derivadas de la inmunodetección de la neprilisina en membranas procedentes de la corteza temporal de la rata. El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con el A β (25-35) (n=5), el carril 3 a ratas tratadas con minociclina (n=5) y el carril 4 a ratas tratadas con minociclina más el A β (25-35) (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Como control de carga se empleó el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina. Panel B: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de la inmunodetección de neprilisina en la corteza temporal de ratas control y ratas tratadas con el A β (25-35), con minociclina o con minociclina más A β (25-35). Se le asignó un valor arbitrario de 100 a la densidad óptica correspondiente al grupo control. La densidad óptica de los grupos experimentales restantes se representan como un porcentaje del control. Los datos representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: *P<0,05; **P<0,01.

4. 3. Efecto de la administración del A β (25-35) y de la minociclina sobre los receptores de somatostatina

La SRIF ejerce sus efectos mediante la unión específica a sus receptores de membrana. Estudios iniciales con membranas procedentes de la corteza temporal revelaron que estos receptores unen la 125 I-Tyr 11 -SRIF-14 de forma dependiente del tiempo, alcanzándose un equilibrio aparente a los 60 min, a 30° C y permaneciendo estable durante al menos 120 min. Por ello, los ensayos de unión competitiva se realizan a 30° C durante 60 min. Las membranas procedentes de la corteza temporal presentaron niveles similares de degradación de la SRIF, no variando más del 10% en todos los grupos experimentales. Sin embargo, la unión específica del trazador a los receptores de SRIF fue significativamente menor en las membranas de ratas tratadas con el A β (25-35) que en el grupo control, tanto en presencia como en ausencia de SRIF (Figura 31).

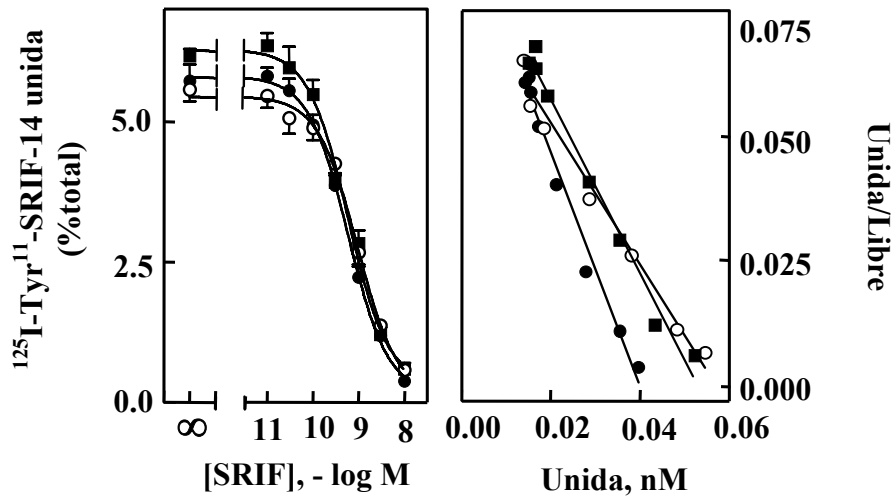


Figura 31. Efecto de la infusión i.c.v. crónica del A β (25-35) durante 14 días sobre la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de corteza temporal de la rata. **Panel izquierdo:** Inhibición competitiva de la unión de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$ a membranas de corteza temporal de ratas por la SRIF fría. Las membranas se incubaron durante 60 min a 30°C en presencia de 250 pM de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$ y concentraciones crecientes del péptido nativo. Los puntos corresponden a ratas control (○; n=5), ratas tratadas con el A β (25-35) (●; n=5) y ratas tratadas con la minociclina más el A β (25-35) (■; n=5). Cada uno de los puntos representa la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. **Panel derecho:** Análisis de Scatchard de los datos de unión.

El análisis de Scatchard (Figura 31, panel derecho; Tabla 18) demuestra que esta disminución se atribuye a una reducción en el número de receptores de SRIF. Asimismo, se observa que la administración de A β (25-35) provoca una disminución en la constante de disociación, en membranas de corteza temporal. El pretratamiento con minociclina sin embargo, previno dicha disminución.



Tabla 18. Efecto de la administración i.c.v. del A β (25-35) y de la minociclina sobre los parámetros de equilibrio de la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de corteza temporal de ratas control (n=5) y ratas tratadas con el A β (25-35) (n=5), con minociclina (n=5) o con minociclina más el A β (25-35) (n=5).

<u>Grupos</u>	<u>Receptores de SRIF</u>	
	<u>Bmax</u>	<u>Kd</u>
Control	441 \pm 20	0,76 \pm 0,12
Aβ(25-35)	239 \pm 41 *	0,34 \pm 0,10 *
Minociclina	423 \pm 64	0,85 \pm 0,08
Minociclina + Aβ(25-35)	464 \pm 56	0,44 \pm 0,09

Los parámetros de unión se calcularon a partir del análisis de Scarchard por regresión lineal. Las unidades para la Kd son nM y para la Bmax femtomoles de SRIF 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.

Como ya se ha comentado en apartados anteriores existen cinco subtipos de receptores de SRIF (sst1-sst5), siendo los subtipos sst1, sst2, sst3 y sst4 los más abundantes en la corteza temporal. Dado que el trazador empleado presenta afinidad similar por los distintos subtipos de sst, quisimos evaluar, a continuación, si el efecto del A β (25-35) era selectivo de uno a varios subtipos de sst. Para ello, se midieron los niveles proteicos de cada subtipo de receptor (sst1-sst4) en membranas de corteza temporal de rata en los distintos grupos experimentales mediante inmunodetección. Los resultados obtenidos demuestran una reducción selectiva del sst2 en corteza temporal de la rata tras el tratamiento crónico con el A β (25-35), sin cambios significativos en los niveles del sst1, sst3 o sst4 (Figura 32). Sin embargo, el pretratamiento de las ratas con minociclina retornó los niveles del sst2 a los valores control.

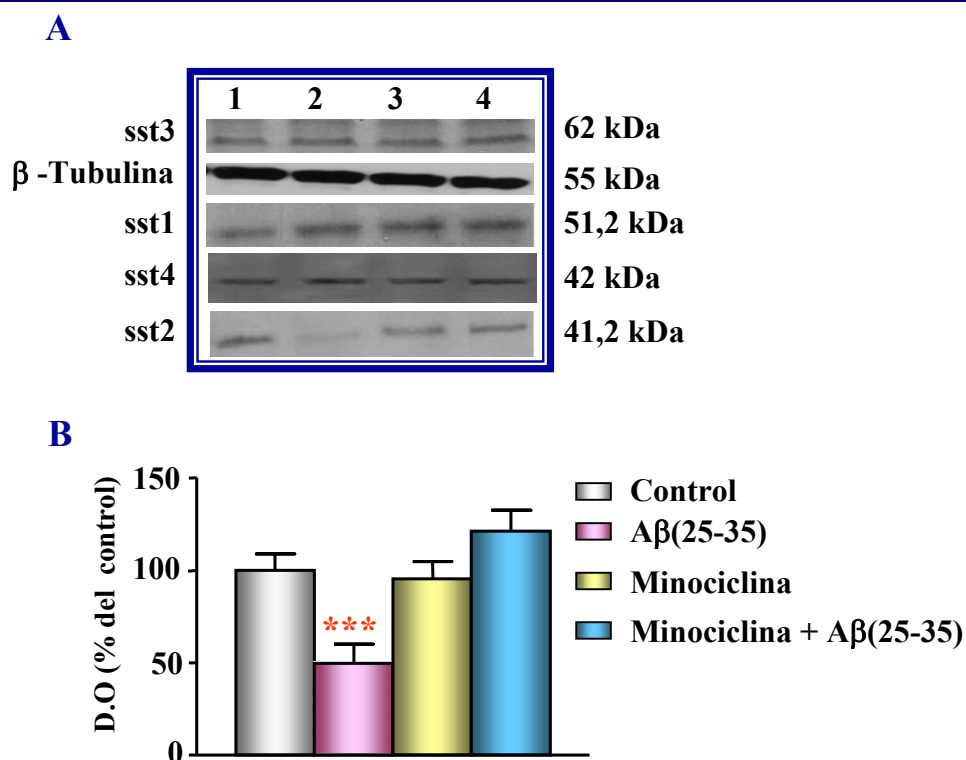


Figura 32. Panel A: Autorradiografías derivadas de la inmunodetección de los subtipos de receptores de SRIF (sst1-sst4) en membranas procedentes de la corteza temporal de la rata. El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con el A β (25-35) (n=5), el carril 3 a ratas tratadas con minociclina (n=5) y el carril 4 a ratas tratadas con minociclina más el A β (25-35) (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Como control de carga se empleó el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina. **Panel B: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de la inmunodetección del subtipo de receptor de SRIF 2 (sst2) en la corteza temporal de ratas control y ratas tratadas con el A β (25-35), con minociclina o con minociclina más el A β (25-35).** Se le asignó un valor arbitrario de 100 a la densidad óptica correspondiente al grupo control. La densidad óptica de los grupos experimentales restantes se representan como un porcentaje del control. Los datos representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: ***P<0,001.

En vista de los resultados obtenidos, se analizaron posteriormente los niveles de ARNm del subtipo sst2 en la corteza temporal de la rata mediante RT-PCR. Con objeto de determinar si la disminución en los niveles proteicos se atribuye a una disminución en la transcripción genética. Se observó que el tratamiento con el A β (25-35) induce una disminución en los niveles de ARNm del sst2 en comparación con los valores control. (Figura 33). Por lo tanto, el A β (25-35) podría estar alterando la expresión del gen del sst2 tanto a nivel de transcripción como de traducción. Sin embargo, el pretratamiento de las ratas con minociclina retornó los niveles de ARNm del sst2 a los valores control.

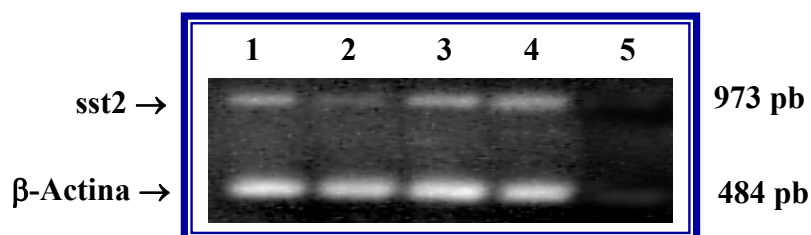


Figura 33. Niveles de ARNm del subtipo de receptor de SRIF 2 (sst2) en la corteza temporal de la rata, detectados mediante RT-PCR. El ARN total aislado de la corteza temporal de ratas control (carril 1), ratas tratadas con el A β (25-35) (carril 2), con minociclina (carril 3) o con minociclina más el A β (25-35) (carril 4) fue sometido a RT-PCR con primers específicos para el sst2 y la β -actina. El carril 5 representa el control de contaminación sin ADNc, para lo cual las muestras fueron procesadas de la misma manera exceptuando que no se sometieron a la transcripción inversa. Los productos resultantes se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Por otro lado, se sabe que estructuralmente, los receptores de SRIF pertenecen a la superfamilia de los GPCR, que son desensibilizados por la familia de quinasas GRKs (Gainetdinov y col., 2004). Por consiguiente, nos planteamos la hipótesis de que una reducción en la disponibilidad de alguna de estas GRK podría inhibir la interacción de la enzima con el receptor sst2, alterando su internación. Para evaluar esta hipótesis, se midió el grado de expresión proteica de la GRK2, isoforma que se expresa mayoritariamente en la corteza cerebral (Erdtmann-Vourliotis y col., 2001), mediante inmunodetección. Como se observa en la [figura 34](#), el tratamiento crónico con el A β (25-35) provoca un aumento significativo en los niveles proteicos de dicha quinasa.

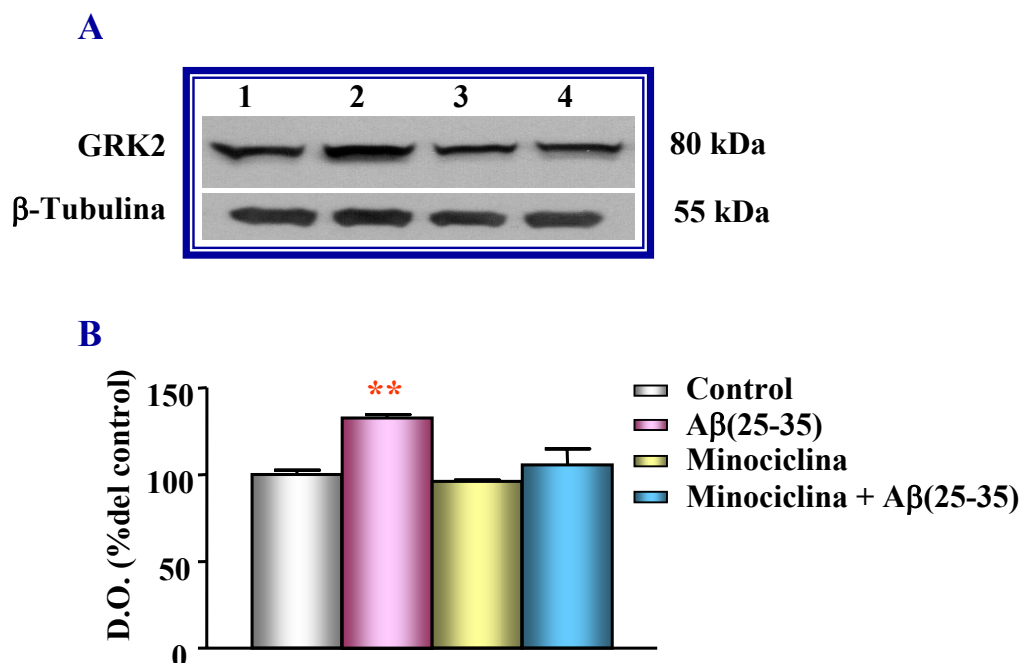


Figura 34. Panel A: Autorradiografías derivadas de la inmunodetección de la isoforma de la familia de kinasas de GPCRs (GRK2) en membranas de corteza temporal de la rata. El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con el A β (25-35) (n=5), el carril 3 a ratas tratadas con minociclina (n=5) y el carril 4 a ratas tratadas con minociclina más el A β (25-35) (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Como control de carga se empleó el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina. **Panel B: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de la inmunodetección de la GRK2 en la corteza temporal de ratas control y ratas tratadas con el A β (25-35), con minociclina o con minociclina más el A β (25-35).** Se le asignó un valor arbitrario de 100 a la densidad óptica correspondiente al grupo control. La densidad óptica de los grupos experimentales restantes se representan como un porcentaje del control. Los datos representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: **P<0,01.

4. 4. Efecto de la administración del A β (25-35) y de minociclina sobre la vía de señalización de la enzima adenilato ciclasa

Como se ha descrito en apartados anteriores, la enzima AC es una de los efectores acoplados vía proteínas Gi a los receptores de SRIF. Se estudió en primer lugar si los tratamientos con A β (25-35), con minociclina o con minociclina más A β (25-35), alteran la actividad enzimática en condiciones basales y estimuladas por FK, así como, la capacidad de la SRIF de inhibir dichas actividades. No se detectaron cambios significativos en la actividad de la AC en ninguno de los grupos experimentales estudiados. Sin embargo, la capacidad de la SRIF para inhibir la actividad enzimática basal y estimulada por FK fue mucho menor en las ratas tratadas con el A β (25-35) en comparación con el grupo control mientras que el pretratamiento con minociclina previno esta disminución (Tabla 19).



Tabla 19. Actividad adenilato ciclasa (AC) (pmol AMPc/min/mg proteína) en presencia o ausencia de forskolina (FK) (10^{-5} M) o somatostatina (SRIF) (10^{-4} M) en membranas de corteza frontoparietal de ratas control (n=5) y ratas tratadas con el A β (25-35), con minociclina o con minociclina más el A β (25-35).

Actividad adenilato ciclasa (pmol AMPc/min/mg de proteína)				
	<u>Control</u>	<u>Aβ(25-35)</u>	<u>Minociclina</u>	<u>Minociclina +Aβ(25-35)</u>
Actividad basal	331 \pm 16	294 \pm 10	325 \pm 26	322 \pm 11
+10⁻⁴ M SRIF	211 \pm 11	243 \pm 9	201 \pm 38	220 \pm 12
+10⁻⁵ M FK	1147 \pm 43	1161 \pm 51	1146 \pm 15	1093 \pm 46
+10⁻⁵ M FK + 10⁻⁴ M SRIF	717 \pm 25	705 \pm 21	704 \pm 29	743 \pm 23
Veces de estimulación	3,3 \pm 0,2	3,7 \pm 0,2	3,6 \pm 0,4	3,4 \pm 0,2
% de Inhibición por SRIF de la actividad AC basal	36,0 \pm 1,5	18,7 \pm 6,2*	40,3 \pm 9,3	34,4 \pm 9,3
% de Inhibición por SRIF de la actividad AC estimulada por FK	37,4 \pm 1,1	22,0 \pm 2,7**	41,6 \pm 13,7	32,0 \pm 1,1

Número de ratas por grupo fueron cinco. Los valores representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: *P<0,05; **P<0,01.

El siguiente paso fue analizar los niveles proteicos de las subunidades α 1, α 2 y α 3 de las proteínas Gi en membranas procedentes de la corteza temporal de ratas control y ratas tratadas con A β (25-35) y/o minociclina. Los resultados obtenidos demuestran que ni el A β (25-35) ni la minociclina no modifican el grado de expresión, a nivel proteico, de dichas subunidades en comparación con el grupo control (Figura 35).

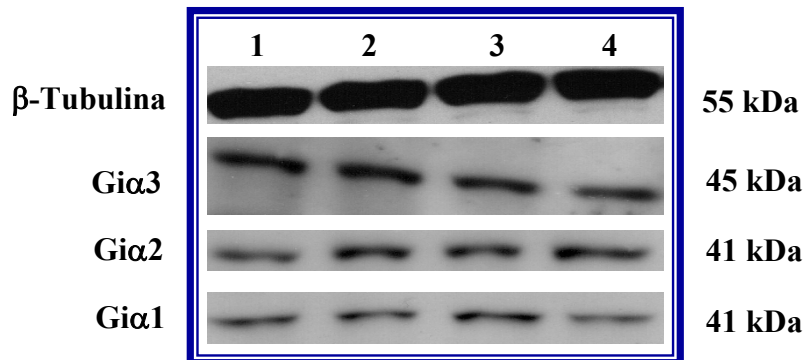


Figura 35. Autorradiografías derivadas de la inmunodetección de las subunidades α 1, α 2 y α 3 de las proteínas Gi en membranas procedentes de la corteza temporal de la rata. El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con el A β (25-35) (n=5), el carril 3 a ratas tratadas con minociclina (n=5) y el carril 4 a ratas tratadas con minociclina más el A β (25-35) (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Como control de carga se utilizó el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina. Estadísticamente, no hay diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales.



5. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SULFADIAZINA SOBRE LAS ALTERACIONES DEL SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO PRODUCIDAS POR EL A β (25-35) EN LA CORTEZA TEMPORAL DE LA RATA

Los estudios preliminares anteriormente descritos han demostrado que la infusión continua del A β (25-35) durante 14 días provoca varias alteraciones en el sistema receptor-efector de la SRIF. Posteriormente, los estudios de Ravina y Hackmann (1967) sugieren que existe otro antibiótico, la sulfadiazina, que podría ejercer un cierto efecto neuroprotector, puesto que este antibiótico mejoraba las capacidades físicas y psíquicas en ancianos. Además la prevalencia de la EA aumenta logarítmicamente con la edad. Por ello, analizamos a continuación el efecto de la coadministración intragástrica de sulfadiazina sobre dichas alteraciones.

El primer paso en dicho estudio fue analizar el efecto de la administración de distintas dosis de la sulfadiazina (20, 40 y 80 mg/Kg) sobre la unión específica de SRIF a sus receptores en membranas de corteza temporal de ratas control y ratas tratadas con el A β (25-35). Los resultados obtenidos demostraron que el mayor efecto se observa a dosis altas de sulfadiazina, puesto que la administración intragástrica de 80 mg/Kg revierte a los valores control (aproximadamente 100%) el número de receptores de SRIF, disminuidos por el A β (25-35) (Tabla 20; Figura 36C). Sin embargo, a dosis más bajas, no se observan cambios ni en el número de receptores, ni en la constante de disociación (Tabla 20; Figura 36A y 36B). Asimismo, la sulfadiazina administrada sola, no produjo ningún efecto sobre dichos parámetros (Tabla 20).

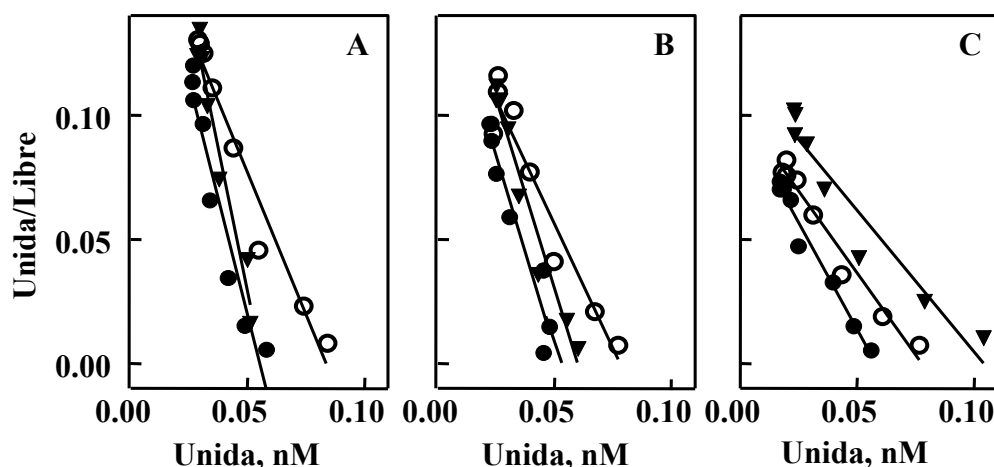


Figura 36. Análisis de Scatchard de la unión específica de ¹²⁵I-Tyr¹¹-SRIF-14 a membranas de corteza temporal de la rata. Las membranas se incubaron durante 60 min a 30°C en presencia de 250 pM de ¹²⁵I-Tyr¹¹-SRIF-14 y concentraciones crecientes del péptido nativo. Los puntos corresponden a ratas control (○; n=5), ratas tratadas con el Aβ(25-35) (●; n=5) y ratas tratadas con el Aβ(25-35) más sulfadiazina (▼) a dosis de 20 mg/Kg (Panel A, n=5), 40 mg/Kg (Panel B, n=5) y 80 mg/Kg (Panel C, n=5). Cada uno de los puntos representa la media ± E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. Los parámetros de equilibrio están incluidos en la Tabla 20.

Tabla 20. Efecto de la administración de concentraciones crecientes de sulfadiazina (20 mg/Kg, 40 mg/Kg y 80 mg/Kg) y de la infusión crónica del Aβ(25-35) sobre los parámetros de equilibrio de la unión de SRIF a sus receptores en membranas de corteza temporal de ratas control (n=5) y ratas tratadas con el Aβ(25-35) (n=5), con sulfadiazina (n=5) o con sulfadiazina más el Aβ(25-35) (n=5).

Grupos	Receptores de SRIF					
	Dosis de Sulfadiazina					
	20 mg/Kg		40 mg/Kg		80 mg/Kg	
	Bmax	Kd	Bmax	Kd	Bmax	Kd
Control	558±3	0,43±0,02	524±14	0,51±0,07	613±58	0,41±0,07
Aβ(25-35)	374±23*	0,38±0,02	364±5**	0,51±0,04	376±45*	0,42±0,08
Sulfadiazina	518±20	0,39±0,01	511±5	0,58±0,03	598±41	0,54±0,10
Sulfadiazina + Aβ(25-35)	364±18**	0,41±0,04	403±3*	0,50±0,05	635±33	0,47±0,07

Los parámetros de unión se calcularon a partir del análisis de Scatchard por regresión lineal. Las unidades para la Kd son nM y para la Bmax femtomoles de SRIF 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 continuación, mediante ensayos de inmunodetección de los distintos subtipos de receptores de SRIF sst1-sst4, se reveló que la disminución del número total de receptores de SRIF, inducida por la toxicidad del A β (25-35), afectaba selectivamente a los niveles proteicos del sst2 (Figura 37). El pretratamiento con sulfadiazina (80 mg/Kg) retornó estos niveles a los valores control en la corteza temporal de la rata.

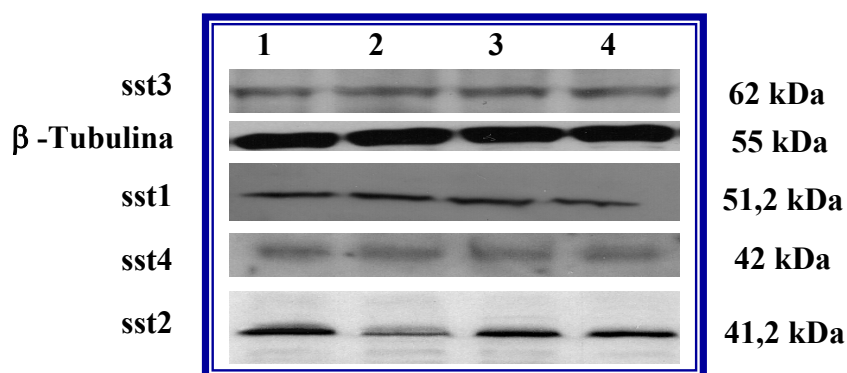


Figura 37. Autorradiografías derivadas de la inmunodetección de los receptores de SRIF (sst1-sst4) en membranas de corteza temporal de la rata. El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con el A β (25-35) (n=5), el carril 3 a ratas tratadas con sulfadiazina (n=5) y el carril 4 a ratas tratadas con sulfadiazina más el A β (25-35) (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Como control de carga se empleó el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina.

Por otro lado, dado que el A β (25-35) produce una disminución de la capacidad de la SRIF para inhibir la actividad enzimática AC, quisimos averiguar si la sulfadiazina (80 mg/Kg) podría prevenir este efecto. Los resultados recogidos en la [tabla 21](#) demuestran que, en efecto, la sulfadiazina ejerce un efecto preventivo sobre dicha disminución. No obstante, la sulfadiazina administrada sola, no ejerce ningún efecto sobre dicho parámetro.



Tabla 21. Actividad adenilato ciclasa (AC) (pmol AMPc/min/mg de proteína) en presencia o ausencia de forskolina (FK) (10^{-5} M) o SRIF (10^{-4} M) en membranas de corteza temporal de ratas control y ratas tratadas con el A β (25-35), con sulfadiazina o con sulfadiazina más el A β (25-35).

Actividad adenilato ciclasa (pmol AMPc/min/mg de proteína)				
	<u>Control</u>	<u>Aβ(25-35)</u>	<u>Sulfadiazina</u>	<u>Sulfadiazina + Aβ(25-35)</u>
Actividad basal	547 \pm 34	501 \pm 18	570 \pm 36	570 \pm 19
+10^{-4} M SRIF	426 \pm 36	413 \pm 25	443 \pm 30	448 \pm 27
+10^{-5} M FK	2083 \pm 138	2162 \pm 125	2289 \pm 102	2281 \pm 165
+10^{-5} M FK + 10^{-4} M SRIF	1925 \pm 80	1922 \pm 146	1986 \pm 66	2042 \pm 198
Veces de estimulación	3,6 \pm 0,13	3,5 \pm 0,17	3,8 \pm 0,16	3,8 \pm 0,15
% de Inhibición por SRIF de la actividad AC basal	28,0 \pm 3,5	15,6 \pm 1,2*	21,0 \pm 0,81	24,6 \pm 3,4
% de Inhibición por SRIF de la actividad AC estimulada por FK	17,4 \pm 3,7	6,6 \pm 0,5*	15,2 \pm 1,7	16,5 \pm 2,7

Número de ratas por grupo fueron cinco. Los valores representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: * $P < 0,05$.

Por último, ni la infusión continua del A β (25-35), ni el pretratamiento con sulfadiazina (80 mg/Kg) modificaron los niveles proteicos de Gi α 1, Gi α 2 o Gi α 3 en membranas de corteza temporal de rata (Figura 38).

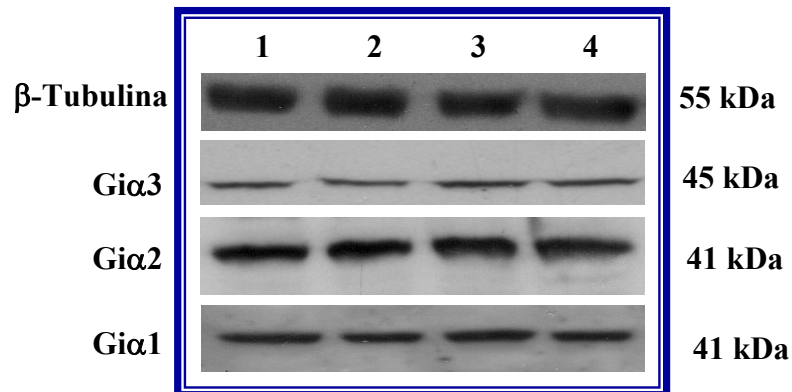


Figura 38. Autorradiografías derivadas de la inmunodetección de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de las proteínas Gi en membranas de corteza temporal de la rata. El carril 1 corresponde a ratas control (n=5), el carril 2 a ratas tratadas con el $A\beta(25-35)$ (n=5), el carril 3 a ratas tratadas con sulfadiazina (n=5) y el carril 4 a ratas tratadas con sulfadiazina más el $A\beta(25-35)$ (n=5). Las autorradiografías mostradas son una muestra representativa de cinco ensayos realizados. Como control de carga se empleó el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina. Estadísticamente, no hay diferencias significativas en comparación con el grupo control.

Sin embargo, la infusión i.c.v. crónica del $A\beta(25-35)$ causó una descenso significativo del contenido de SRIF-IR en la corteza temporal de la rata, que retornó a los valores control mediante la coadministración de sulfadiazina (Figura 39).

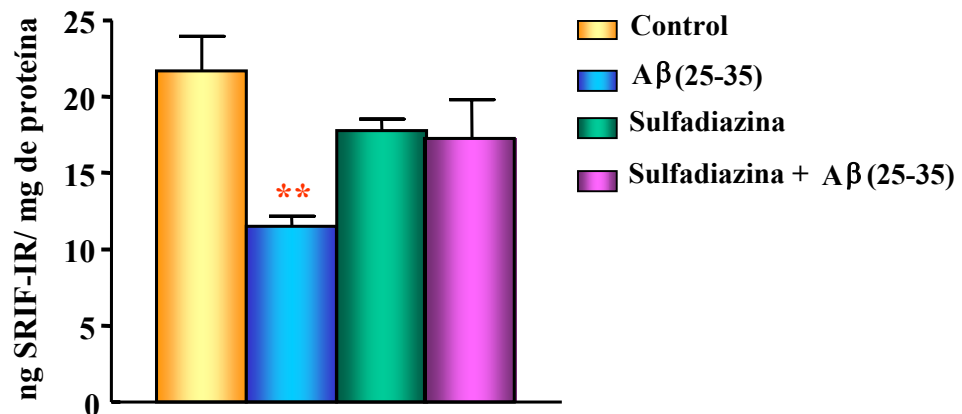


Figura 39. Efectos de la infusión continua del $A\beta(25-35)$, de la administración de sulfadiazina y de la coadministración de sulfadiazina más el $A\beta(25-35)$, sobre los niveles de somatostatina inmunorreactiva (SRIF-IR) en la corteza temporal de la rata. Los valores se expresan como la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: **P<0,01.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran por primera vez que el A β (25-35) altera el sistema receptor-efector de la SRIF en el hipocampo así como en la corteza frontal, parietal y temporal de la rata.

En este estudio se empleó un corto fragmento del A β de 11 aminoácidos, el A β (25-35), localizado en el extremo C-terminal del A β (1-42), para reproducir parcialmente la EA en animales de experimentación. Se eligió este fragmento puesto que estudios recientes han revelado que presenta mayor toxicidad que el fragmento A β (1-42) o el fragmento A β (1-40). Así, aunque el A β (1-42) y el A β (25-35) provocan muerte neuronal, oxidación de proteínas y peroxidación de lípidos en cultivos primarios de neuronas, el A β (25-35) actúa con mayor rapidez que el péptido nativo, puesto que exhibe antes la toxicidad (Varadarajan y col., 2001). Inicialmente, existía una cierta controversia acerca de la presencia del A β (25-35) *in vivo*. No obstante, los estudios llevados a cabo por Kubo y col. (2002) sugieren que el A β (1-40) insoluble, presente en las PNS típicas de la EA, es racemizado en la Ser²⁶, posiblemente durante el envejecimiento, formándose el [D-Ser²⁶]A β (1-40) soluble; éste es liberado de las PNS y degradado por varias proteasas, originando así los fragmentos tóxicos [D-Ser²⁶]A β (25-35) y [D-Ser²⁶]A β (25-40), resistentes a proteasas (Kaneko y col., 2001). Dichos fragmentos se distribuyen por el cerebro causando pérdida neuronal y alteraciones neurotóxicas características de la EA (Figura 40). Además, mediante el uso de anticuerpos específicos contra el [D-Ser²⁶]A β (25-35) y contra el [D-Ser²⁶]A β (25-40), se ha demostrado claramente que estos fragmentos tóxicos están presentes en el cerebro de pacientes con EA pero no en controles de avanzada edad, por lo que su presencia no está ligada a la misma (Kubo y col., 1999). Por otro lado, Maurice y col., (1996) demostraron que la administración i.c.v. del A β (25-35) genera depósitos amiloideos diseminados ampliamente por toda la corteza frontoparietal. Estos resultados ilustran la relativa facilidad con la que el A β (25-35) difunde a lo largo del cerebro después de su administración en el ventrículo lateral.

Aunque la infusión i.c.v. del A β (25-35) es un modelo parcial de la EA, varios autores han revelado que dicha infusión mimetiza las alteraciones cognitivas presentes en el cerebro de enfermos con esta enfermedad. Se ha demostrado que la administración i.c.v. del A β (25-35) a ratas induce cambios espontáneos de conducta (Stepanichev y col., 2000), alteraciones en la capacidad de aprendizaje (Yamaguchi y Kawashima, 2001) e incluso en el reconocimiento social



(Stepanichev y col., 2000). Además, el A β (25-35) provoca la pérdida de la memoria espacial y de la capacidad de respuesta ante un estímulo de alerta (Yamaguchi y Kawashima, 2001; Sun y Alkon, 2002). El conjunto de estas evidencias pone de manifiesto que el fragmento corto A β (25-35) es el dominio funcional del A β responsable de sus propiedades neurotóxicas. Por otro lado, se ha observado daño celular y pérdida neuronal en los subcampos CA1 y CA3 del hipocampo, así como en el neocortex y ganglio basal después de la administración i.c.v. del A β (25-35) a ratas de avanzada edad (Stepanichev y col., 2000).

Las dosis del A β (25-35) y los periodos de tiempo empleados en este trabajo se eligieron en base a los estudios previos realizados por diversos autores que demostraron que estas condiciones experimentales reproducían los signos/alteraciones típicas de la EA en animales (Nitta y col., 1994; Giovannelli y col., 1995; Nag y col., 1999; Fukuta y col., 2001).

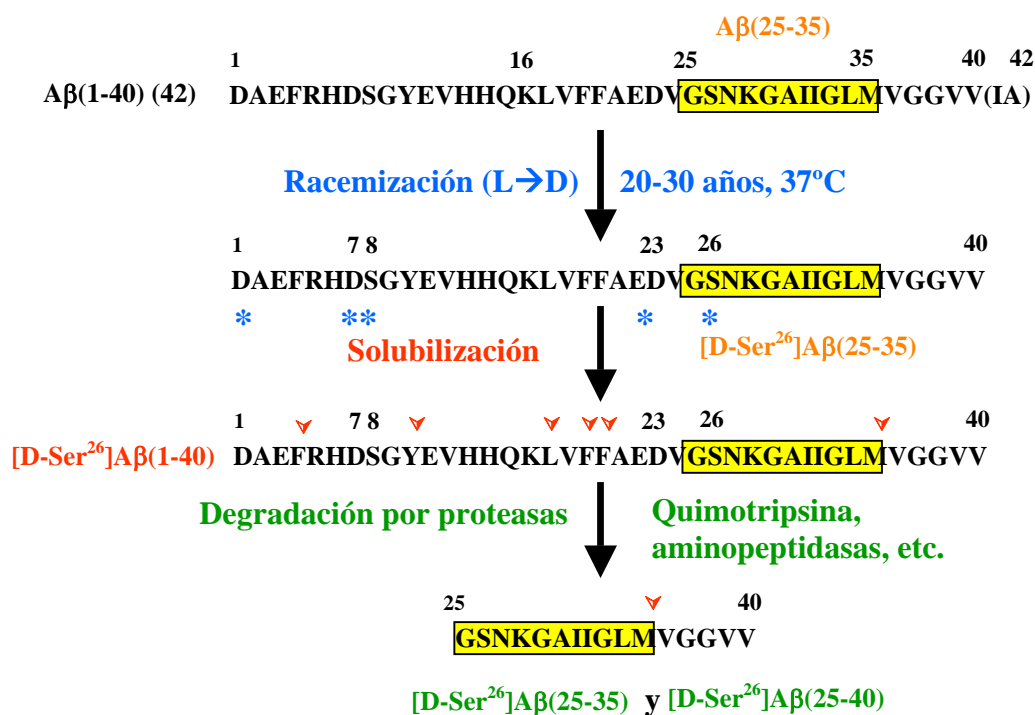


Figura 40. Modelo propuesto para la producción de los fragmentos tóxicos [D-Ser²⁶]A β (25-35) y [D-Ser²⁶]A β (25-40) a partir de la racemización del [D-Ser²⁶]A β (1-40) en el cerebro de pacientes con EA. El A β (1-40) y el A β (1-42) permanecen durante 20 ó 30 años acumulados, formando las placas neuríticas seniles (PNS). Los asteriscos (*) indican los aminoácidos Serina (S) y Aspartato (D) que son racemizados. Las flechas (v) indican los sitios por los que el [D-Ser²⁶]A β (1-40) es escindido por las proteasas. Los recuadros representan la localización del [D-Ser²⁶]A β (25-35).

En la EA se encuentran alterados diversos sistemas de neurotransmisión (Cowburn y col., 1996) así como los niveles tisulares de distintos neurotransmisores. Así, en la corteza cerebral de



pacientes con EA, se ha detectado una reducción significativa de los niveles de SRIF (Davies y col., 1980), un neuropéptido encargado de regular procesos de aprendizaje y de memoria (Cacabelos y col., 1988; Dournaud y col., 1996). Por otro lado, diversos autores también han encontrado una disminución del número de receptores de SRIF en varias áreas cerebrales de enfermos con EA (Beal y col., 1985; Bergström y col., 1991; Krantic y col., 1992). Por todo ello, nos planteamos que sería de gran interés profundizar en el efecto del A β (25-35) sobre el sistema somatostatinérgico cerebral, dada su participación en procesos cognitivos.

Las áreas cerebrales elegidas para este estudio fueron el hipocampo y la corteza frontal, parietal y temporal en base a su implicación en procesos cognitivos, tanto en humanos como en animales (Kesner y Hopkins, 2006; Myhrer, 1997), así como su riqueza en neuronas somatostatinérgicas y en base a las lesiones de estas áreas descritas en enfermos de EA. Estudios inmunohistoquímicos han revelado que en el hipocampo existe un alto contenido de SRIF en las interneuronas y en una profunda red de fibras nerviosas extrínsecas e intrínsecas, que se proyectan hacia las neuronas piramidales y granulares (Bakst y col., 1986; Jöels y col., 1990). En la corteza cerebral, se ha detectado la presencia de SRIF-IR y de ARNm de la SRIF en neuronas no piramidales, localizadas en las capas II-III y V-VI, donde las terminaciones axonales de dichas neuronas se despliegan verticalmente para terminar a menudo en la capa I (Garret y col., 1994; González-Albo y col., 2001). Asimismo, estas áreas cerebrales poseen un gran número de receptores de SRIF (Srikant y Patel, 1981; Epelbaum y col., 1982; Reubi y Maurer, 1985). En el hipocampo, los receptores de SRIF se predominan en las regiones CA1 y CA2 (Csaba y Dournaud, 2001), mientras que en la corteza cerebral, estudios autorradiográficos han demostrado que, estos receptores se localizan mayoritariamente en las capas V-VI y, en menor proporción, en las capas I-IV.



1. Efecto de la administración aguda y crónica del A β (25-35) sobre el sistema somatostatinérgico en el hipocampo de la rata.

Los efectos del A β (25-35) sobre diferentes componentes de la vía de señalización de la SRIF fueron mas pronunciados después de la infusión crónica que después de una sola administración del péptido, incluso siendo la dosis aguda ligeramente más alta. Dornan y col. (1993) no encontraron ningún depósito amiloideo en el hipocampo de la rata después de la administración de una sola dosis del A β (25-35). Sin embargo, los estudios realizados por Nag y col. (1999) han revelado la presencia generalizada del A β inmunorreactivo en ratas que recibieron una infusión i.c.v. crónica de dicho péptido durante 14 días, logrando así administrar una concentración final de 4,2 nmol del A β , la misma dosis que se ha utilizado en el presente estudio. De este modo, la característica temporal observada en nuestro estudio implica un proceso patológico crónico en el hipocampo que es desencadenado por la acumulación gradual del A β (25-35).

El contenido de SRIF-IR en el hipocampo de ratas control fue similar al descrito previamente por nuestro grupo (Puebla y Arilla, 2003) y otros autores (Srikant y Patel, 1981). El presente trabajo demuestra que la infusión i.c.v. crónica del A β (25-35) induce una disminución de los niveles de SRIF-IR en el hipocampo de la rata. Este resultado se correlaciona con la alteración en el contenido de SRIF presente en el cerebro y LCR de enfermos con EA (Davies y col., 1980; Slama y col., 1991). Sin embargo, se desconocía si estas alteraciones eran causadas directamente por el efecto tóxico del A β (25-35). Sería razonable pensar que esta disminución podría ser consecuencia de una pérdida de neuronas somatostatinérgicas. No obstante, Dournad y col. (1994) observaron que el déficit de SRIF presente en enfermos de EA no se debe a una pérdida de interneuronas somatostatinérgicas, mientras que Pierotti y col. (1985) sugieren que es consecuencia de una reducción de la proteína precursora de la SRIF. Por consiguiente, estos estudios parecen descartar la hipótesis anteriormente planteada. Por otro lado, los cambios observados en el contenido de SRIF-IR podrían ser secundarios a la disfunción colinérgica producida en la EA y en ratas tratadas con el A β (Itoh y col., 1996). Numerosos estudios electrofisiológicos (Matsuoka y col., 1991), neurobioquímicos (Barrios y col., 1990; Zee y col., 1991; Alvaro y Arilla, 1992) y del comportamiento (Ohno y col., 1993) han demostrado que existe una interacción estrecha entre los sistemas somatostatinérgico y colinérgico en el hipocampo y corteza de mamíferos. Así, se ha descrito que en el hipocampo de la rata, las



terminaciones colinérgicas establecen sinapsis con células inmunoreactivas para la SRIF (Leranth y Frotscher, 1987). Además, el trabajo realizado por Nag y Tang (1998) demostró que la infusión intraventricular en la rata de la inmunotoxina 192 IgG-saporina, una potente toxina para las neuronas colinérgicas, conduce a una reducción significativa de los niveles de SRIF en la corteza cerebral e hipocampo de la rata. Alternativamente, se ha descrito que el A β (1-42) altera la vía de señalización mediada por la proteína CREB en neuronas (Tong y col., 2001). Se sabe que el gen de la SRIF contiene en su región promotora el elemento de respuesta a AMPc, CRE. Por consiguiente, postulamos que la reducción del contenido de SRIF podría ser consecuencia de una menor tasa de transcripción génica. La infusión i.c.v. crónica del A β (25-35) provocó una disminución significativa en los niveles proteicos de la proteína p-CREB en el hipocampo de la rata. Por consiguiente, dado que la forma fosforilada de CREB es la que se une al CRE, estimulando la transcripción, estos resultados apoyan la hipótesis de que la reducción en los niveles de SRIF-IR podría ser totalmente o parcialmente atribuible a una menor tasa de transcripción del gen de la SRIF en el hipocampo de ratas tratadas con el A β (25-35).

La infusión i.c.v. del A β (25-35) durante 14 días indujo una disminución de la actividad enzimática AC, en condiciones basales y estimuladas por FK, en membranas hipocampales de rata. Este resultado concuerda con un estudio portmortem llevado a cabo por Ohm y col. (1991) que reveló que en el hipocampo de pacientes con EA, existe una reducción de la actividad AC estimulada por FK. Las técnicas de clonación molecular han permitido identificar en mamíferos nueve genes que codifican para las distintas isoformas de AC de membrana y un gen que codifica para la isoforma soluble (Sunahara y Taussig, 2002). Para profundizar en esta disminución de la actividad AC, analizamos cuatro isoformas de la AC: AC I, AC V/VI y AC VIII. Las isoformas AC I y AC VIII se expresan exclusivamente en el cerebro y se ha postulado que ejercen un papel primordial en el aprendizaje y la memoria. Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran una reducción selectiva de los niveles proteicos de la isoforma AC I en el hipocampo de la rata, como resultado de la infusión crónica del A β (25-35). Esta disminución podría explicar la atenuación de la actividad enzimática AC que observamos en ratas tratadas con el A β (25-35). Además, es plausible que esta reducción en los niveles de AC I contribuya a una menor fosforilación, mediada por la PKA, de la proteína CREB en las neuronas somatostatinérgicas, lo que a su vez conduciría a la disminución del contenido de SRIF-IR en el hipocampo de la rata. Estos resultados concuerdan con el hecho de que la SRIF, al igual que AC I y AC VIII, está involucrada en procesos cognitivos. Por otro lado, la infusión crónica del A β (25-



35) no alteró el grado de expresión de la isoforma AC VIII, al contrario que lo observado en el hipocampo de pacientes con EA, donde se detectó una ligera disminución de esta isoforma (Yamamoto y col., 2000). También analizamos las isoformas AC V/VI, puesto que ambas son abundantes en el cerebro y en el corazón. Además se ha demostrado que las tres proteínas Gi que acoplan los receptores de SRIF a la enzima AC, $G_{i\alpha 1}$, $G_{i\alpha 2}$ y $G_{i\alpha 3}$, inhiben selectivamente estas dos isoformas de la AC (Sunahara y Taussig, 2002). Sorprendentemente, detectamos un aumento de los niveles proteicos de la AC V/VI en las membranas hipocampales derivadas de ratas tratadas crónicamente con el $A\beta$. Aunque se desconoce el significado funcional de este aumento, estos resultados parecen argumentar en contra de la posibilidad de que la baja expresión de AC I observado en nuestro estudio sea debido a una pérdida neuronal, teniendo en cuenta que en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de pacientes con EA se han detectado células dañadas y pérdida neuronal; si este fuera el caso, todas las isoformas de AC estudiadas estarían disminuidas.

Los niveles de las subunidades α de las proteínas Gi no fueron modificados ni por la administración i.c.v. aguda ni por la administración crónica del $A\beta(25-35)$. Sin embargo, la conservación de los niveles de las proteínas G no es necesariamente indicativo de la integridad de la transducción de la señal en la enfermedad. Así, mientras que el número de receptores de SRIF no se altera en el presente estudio, ni en el hipocampo de enfermos con EA, la capacidad de la SRIF para inhibir la enzima AC está reducida. Este resultado está en concordancia con lo obtenido por Cowburn y col., (1991) en la corteza temporal de pacientes con EA. En conclusión, la pérdida de la actividad AC no puede atribuirse a una alteración en la expresión de Gi.

Aunque de momento no se conoce bien el mecanismo a través del cual el $A\beta(25-35)$ induce sus efectos, podría estar relacionado con su capacidad del $A\beta(25-35)$ para iniciar la peroxidación de lípidos de membrana o aumentar el estrés oxidativo (Mark y col., 1997; Stepanichev y col., 2004). En este aspecto, se ha demostrado que la infusión directa del $A\beta$ en el cerebro de la rata provoca un aumento significativo en la producción de especies reactivas de oxígeno (Parks y col., 2001; Stepanichev y col., 2004). Además, se ha descrito que la administración del $A\beta(25-35)$ conduce a un estrés oxidativo, de desarrollo gradual, en el hipocampo de la rata.

Los resultados de este estudio indican que no hay cambios significativos en la capacidad de unión de la SRIF a sus receptores en el hipocampo de ratas tratadas con el $A\beta(25-35)$ en comparación con el grupo control. Este resultado se correlaciona con algunos estudios (Whitford

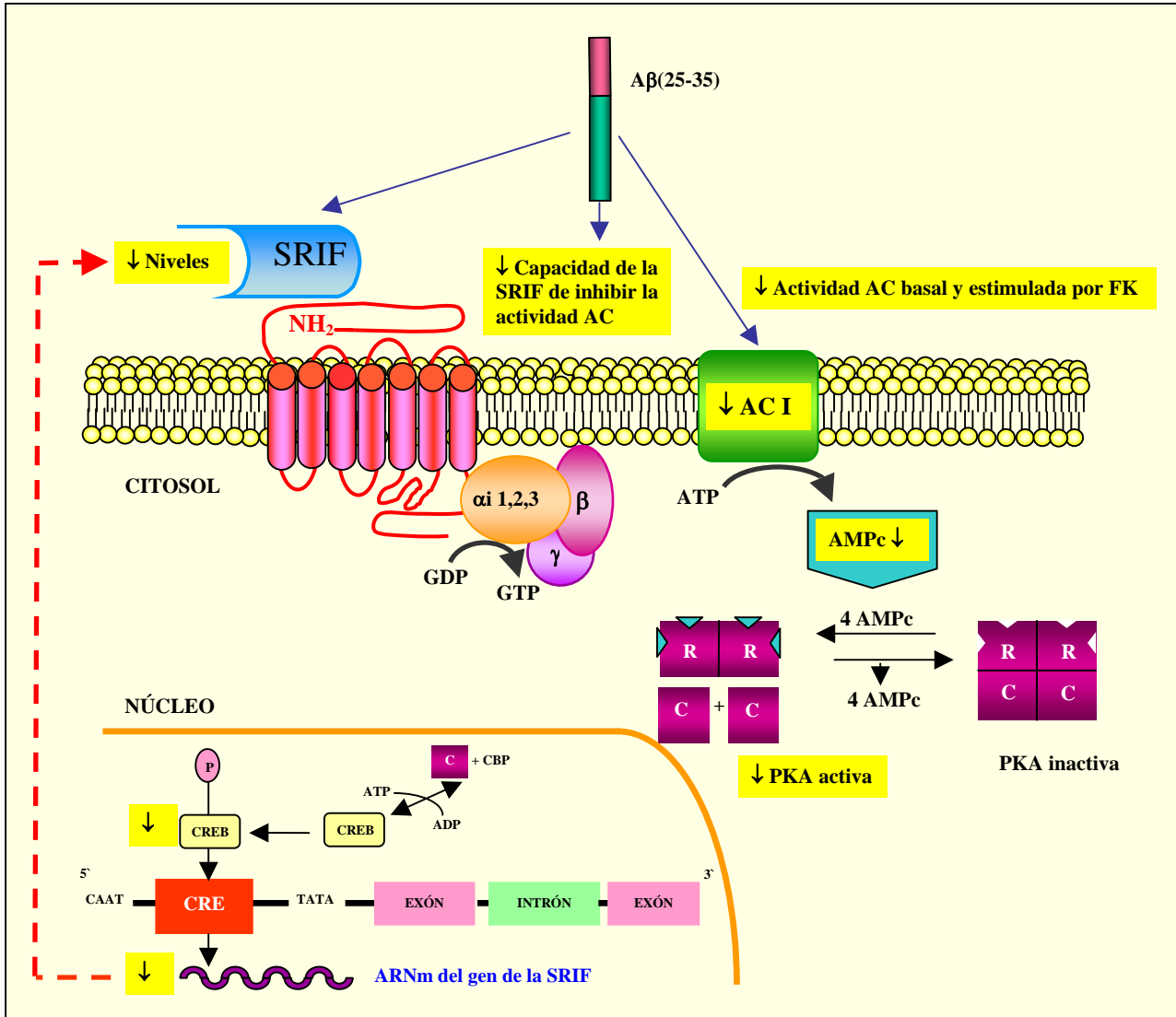


y col., 1988; Slama y col., 1991), pero no con otros (Beal y col., 1985) llevados a cabo en el hipocampo de enfermos con EA. Slama y col. (1991), por ejemplo, observaron que no hay cambios significativos en la capacidad total de unión de la SRIF en el hipocampo de pacientes con demencia en comparación con el grupo control. Sin embargo, ya que el trazador que utilizamos en los ensayos de unión presenta una afinidad similar por los cinco subtipos de receptores de SRIF, medimos los niveles proteicos de cada subtipo de receptor excepto los del subtipo sst5, ya que éste se expresa muy poco en el hipocampo de la rata. Los análisis por inmunodetección revelaron que no hay diferencias significativas en los niveles proteicos de los subtipos sst1, sst2, sst3 o sst4 entre el grupo control y el grupo de ratas tratadas con el A β (25-35), lo que concuerda con los datos de unión obtenidos.

En conjunto, los presentes resultados demuestran que aunque los receptores de SRIF hipocampales están considerablemente bien conservados después de la infusión crónica del A β (25-35), su funcionalidad parece estar comprometida a nivel de la transducción de la señal, como demuestra la disminución de la actividad AC basal y estimulada por FK, así como la atenuación del efecto inhibitorio de la SRIF sobre estas actividades. Además, el A β (25-35) induce una disminución del contenido de SRIF-IR en el hipocampo de la rata. Por consiguiente, estos resultados parecen implicar al A β en la alteración de la transmisión somatostatinérgica descrito en la EA. Dado que la infusión i.c.v. crónica del A β (25-35) perjudica la capacidad de aprendizaje y memoria, mientras que la SRIF facilita estas funciones, las alteraciones descritas en el presente trabajo podrían estar correlacionadas con la disminución de los procesos cognitivos descrito previamente en las ratas tratadas con el A β .



Resumen de los efectos del A β (25-35) sobre el sistema somatostatinérgico en el hipocampo de la rata.





2. Efecto de la administración del A β (25-35) sobre el sistema somatostatinérgico en la corteza frontal y parietal de la rata.

En el grupo control, los niveles de SRIF-IR fueron similares a los descritos previamente por nuestro grupo y por otros autores (Patel y Reichlin, 1978; Puebla y Arilla, 2003). La infusión i.c.v. crónica del A β (25-35) indujo una reducción del contenido de SRIF-IR en la corteza en la frontal y parietal siendo más acusada en la corteza frontal (36%) que en la parietal (25%). Existe un paralelismo entre esta alteración de la SRIF-IR y la que se ha detectado en el cerebro de pacientes con EA (Davies y col., 1980). Sin embargo, se sabe que la deficiencia de SRIF en la demencia senil del tipo Alzheimer no se debe a la pérdida de interneuronas productoras de SRIF sino a una reducción de la proteína precursora de SRIF (Pierotti y col., 1985). Esto podría ser debido a una reducción significativa de los niveles de ARNm de la SRIF (Dournaud y col., 1994). Recientemente, varios autores han sugerido que la disminución del contenido en SRIF es debido a complejas alteraciones en el proceso de regulación de la síntesis y/o en el procesamiento posttraduccional de la SRIF, provocando alteraciones en la vida media del péptido (Weber y col., 1992; Strittmatter y col., 1997). A su vez, Tran y col. (2001) describieron que la vía de señalización de la proteína CREB en neuronas está alterada por el A β (25-35), a una concentración en la que la supervivencia celular no está comprometida. Por ello, dado que el CRE en el promotor del gen de la SRIF contiene sitios de unión para la proteína CREB que son esenciales para la transcripción regulada por AMPc del gen, este mecanismo podría explicar la reducción en el contenido de SRIF-IR detectada en el presente estudio.

En la corteza frontoparietal de ratas control, los parámetros de equilibrio de los receptores de SRIF fueron similares a los obtenidos anteriormente por otros autores (Srikant y Patel, 1981; Epelbaum y col., 1982). Después de 14 días de la administración de una sola dosis del A β (25-35) así como después de la infusión i.c.v. continua del A β (25-35), se detectó una disminución en el número de receptores de SRIF en la corteza frontoparietal de la rata en contraposición al hipocampo, donde el A β (25-35) no ejerció ningún efecto. Actualmente, se desconoce el mecanismo a través del cual el A β (25-35) induce dicha disminución. Sin embargo, si la disminución en el contenido de SRIF-IR observada en nuestro estudio después de la infusión del A β es consecuencia directa de un aumento de la liberación de SRIF, entonces este incremento podría provocar una regulación a la baja de los receptores de SRIF. Por otro lado, el CRE localizado en el promotor de los genes que codifican para los subtipos sst2 y sst3 (Glos y col.,



1998; Woltje y col., 1998), que se expresan mayoritariamente en el cerebro de la rata, es regulado por el factor de transcripción CREB (Montminy y col., 1996). Por consiguiente, dado que el A β (25-35) altera la vía de señalización de la proteína CREB en las neuronas, es posible, que el mecanismo involucrado en la disminución del número de receptores provocado por el A β (25-35) sea debido, al menos en parte, a una disminución en la transcripción de estos dos genes.

Finalmente, Stepanichev y col. (2000) demostraron que después de la administración i.c.v. del A β (25-35), se observa daño celular y pérdida neuronal en el neocortex de las ratas. Dado que los receptores de SRIF se expresan en distintos tipos celulares en el cerebro, estos hallazgos pueden aclarar por qué en el presente estudio se encontró una reducción del número de receptores de SRIF. Por otra parte, un aumento de la concentración del A β en el cerebro como consecuencia de la infusión continua del péptido podría alterar el metabolismo de los fosfolípidos de membrana, induciendo una desorganización de la misma (Prasad y col., 1998; Wells y col., 1995), lo que a su vez dificultaría la unión de la SRIF a sus receptores.

Con el fin de averiguar si esta alteración es producida específicamente por el A β (25-35), analizamos el efecto del A β (35-25), secuencia inversa de la región activa del péptido anteriormente citado, sobre los parámetros de unión de la SRIF. Así observamos que la administración del A β (35-25) no alteró los parámetros de unión de la SRIF, en ninguno de los periodos de tiempo estudiados, lo que indica que la disminución del número de receptores de SRIF inducida por el A β (25-35) es un efecto específico de dicho péptido. Se ha demostrado que en cultivos celulares, la inversión de la secuencia aminoacídica en el A β (35-25) altera las propiedades de agregación del péptido nativo, reduciendo así sus efectos neurotóxicos (Buchet y col., 1996).

En todos los grupos experimentales estudiados, la actividad de la AC en condiciones basal y estimuladas por FK fue inhibida por la SRIF, lo que se corresponde con trabajos previos (Schettini y col., 1989; Bergström y col., 1991; Garlind y col., 1992; Puebla y Arilla, 1995). Se requirió una concentración de SRIF (10^{-4} M) para observar dicha disminución. En un estudio realizado por nuestro grupo, se analizó el efecto inhibitor de concentraciones crecientes de SRIF sobre la actividad de esta enzima, observando que solamente la mayor concentración de SRIF analizada (10^{-4} M) producía una inhibición significativa. Por ello, se escogió esta concentración para nuestros estudios posteriores sobre AC. Además hay que destacar que varios estudios sobre la capacidad de la SRIF de inhibir la AC se llevaron a cabo en líneas celulares que expresan



mayores niveles de receptores de SRIF que los tejidos animales. Por otro lado, es tentador especular que dado que la corteza frontoparietal es rica en neuronas somatostatinérgicas, la cantidad de SRIF liberada podría ser suficientemente elevada como para justificar la alta concentración del péptido que hemos utilizado.

La administración del A β (25-35) provocó una disminución en la capacidad de la SRIF para inhibir la actividad AC basal y estimulada por FK a los 14 días de su administración única y después de la infusión i.c.v. continua del péptido. Sin embargo, no se detectaron cambios en la actividad AC ni en condiciones basales ni tras la estimulación de la enzima por FK, lo que sugiere que la reducida sensibilidad de la AC a la inhibición por SRIF no se debe a una alteración en la subunidad catalítica de dicha enzima. Además, los análisis por inmunodetección de las proteínas Gi α 1, Gi α 2 y Gi α 3 indican que los niveles de estas proteínas no fueron modificados por el A β (25-35). En conjunto, los presentes resultados sugieren que la reducción en la inhibición por SRIF de la actividad AC es probablemente debido a la disminución del número de receptores de SRIF. Asimismo, Kato y col., (1991) describieron que no hay diferencias significativas en los niveles proteicos de Gi α 2 en la corteza temporal de enfermos con EA, en comparación con los valores control.

En relación a la especificidad del A β (25-35) sobre el sistema somatostatinérgico, otros autores han demostrado que este péptido también ejerce efectos sobre la unión de distintos radioligandos a receptores de aminoácidos excitatorios y sobre canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Cowburn y col., 1997), evidenciado por una afinidad selectiva del péptido por los sitios de unión de glutamato y de glicina del receptor de NMDA. Además, se ha descrito que el A β (25-35) modifica el número y la afinidad de los receptores muscarínicos, nicotínicos y de bradiquinina (Huang y col., 1998; Guan y col., 2003). En base a todos estos resultados, se puede concluir que el sistema somatostatinérgico es vulnerable a la toxicidad del A β (25-35), junto con otros sistemas de transmisión neuronal. No podemos, por lo tanto, descartar la posibilidad de que las infusiones del A β llevadas a cabo en nuestro estudio produzcan un efecto tóxico generalizado que podría causar efectos inespecíficos sobre otros sistemas de neurotransmisión. El significado de nuestros resultados es, por el momento, difícil de evaluar. Sin embargo, varios autores han demostrado que este fragmento del A β posee potentes propiedades amnésicas (Olariu y col., 2001; Yamaguchi y Kawashima, 2001).

Recientemente, Dournaud y col. (1996) sugirieron que las interneuronas somatostatinérgicas de la corteza frontal y parietal podrían participar en los procesos de



aprendizaje, así como en la regulación de la memoria espacial. Por consiguiente, la reducción del número de receptores de SRIF observada en ambas áreas corticales, podría estar implicada en el daño cognitivo descrito después de la administración del A β (25-35). En conclusión, los presentes resultados sugieren que el A β podría estar involucrado en las alteraciones del sistema somatostatinérgico descritas en la EA. No obstante, hay que considerar que existen algunas diferencias sutiles entre el A β (25-35) y el A β (1-42), como se ha descrito anteriormente. Por consiguiente, hay que ser cauteloso en la interpretación de nuestros resultados puesto que podrían existir diferencias importantes en el mecanismo de acción de ambos péptidos en la patogénesis de la EA. Serían necesarios estudios adicionales para explorar estas posibles diferencias y así comparar los efectos de ambos péptidos. Asimismo, no se puede excluir la idea de que el daño cognitivo asociado a la administración del A β (25-35) sea debido, al menos en parte, a alteraciones de otros sistemas neuronales.



3. Efecto del A β (25-35) y de la minociclina sobre el sistema somatostatinérgico en la corteza temporal de la rata.

Como se ha descrito anteriormente, el A β (25-35) disminuye la actividad del sistema somatostatinérgico en el hipocampo, la corteza frontal y la corteza parietal de la rata, observándose algunos efectos específicos de área. En base a estos hallazgos preliminares, quisimos profundizar en el efecto del A β (25-35) en otras regiones cerebrales, por lo que examinamos su impacto en la corteza temporal de la rata, un área densamente inervada por fibras somatostatinérgicas intrínsecas y extrínsecas que también está implicada en funciones cognitivas (Barton, 2003) y donde las lesiones en pacientes con EA son más severas (Selkoe, 2001; Masters y Beyreuther, 2005). Asimismo, nos propusimos evaluar el posible efecto neuroprotector de la minociclina; por lo cual valoramos si esta tetraciclina era capaz de proteger al sistema somatostatinérgico cerebral de las alteraciones provocadas por la infusión continua del A β (25-35).

La infusión i.c.v. crónica del A β (25-35) provocó una disminución significativa (40%) del contenido de SRIF-IR en la corteza temporal de la rata, similar a la obtenida en corteza frontal (36%) y ligeramente más acusada que la observada en la corteza parietal (25%) e hipocampo (20%). Este resultado sugiere que la reducción de los niveles de SRIF detectado previamente en cerebro postmortem de pacientes con EA (Dawbarn y col., 1986) podría estar causada directamente por el A β (25-35). La reducción que observamos en los niveles tisulares de SRIF-IR podría reflejar cambios en la tasa de liberación del neuropéptido, una mayor degradación del mismo o bien modificaciones en la síntesis proteica y/o transcripción génica. Con el fin de esclarecer el mecanismo subyacente, se procedió a medir los niveles de ARNm de la SRIF por RT-PCR, observándose una disminución de dichos niveles tras la administración crónica del A β (25-35), lo que apunta hacia una disminución en la tasa de transcripción del gen de la SRIF. Por otro lado, los niveles inmunorreactivos de p-CREB también estaban disminuidos en la corteza temporal de la rata después de la administración continua del A β (25-35). En neuronas, la expresión de genes dirigida por el CRE requiere la acción de las vías de señalización del AMPc o del Ca²⁺ para facilitar la fosforilación de CREB en la Ser₁₃₃ por ERK 1/2 y probablemente por otras proteínas quinasas. Esta fosforilación es esencial para la actividad transcripcional de CREB, facilitando así el reclutamiento del mismo así como su interacción con la proteína CBP. Dado que el gen que codifica para la SRIF contiene CRE en su región promotora, la reducción de los niveles de p-CREB explicaría la reducción en los niveles de ARNm de la SRIF y, por



ende, de la SRIF-IR. Este resultado concuerda con algunos estudios previos realizados *in vitro* en los que se observó que el A β (1–42) altera la vía de señalización de CREB en cultivos de neuronas corticales (Tong y col., 2001) así como en cultivos de neuronas hipocampales después de la estimulación con glutamato (Vitolo y col., 2002). En resumen, el conjunto de los resultados obtenidos nos permite concluir que el A β (25-35) disminuye la tasa de transcripción del gen de la SRIF.

El hecho *per se* de que el A β (25-35) bloquea la fosforilación de CREB en la corteza temporal podría tener consecuencias fisiológicas importantes. Actualmente, el estudio de la proteína CREB ha recibido una gran atención por parte de diversos investigadores ya que se ha involucrado esta proteína en procesos de memoria y aprendizaje, tanto en invertebrados como en mamíferos (Bourtchuladze y col., 1994; Yin y col., 1994; Lonze y Ginty, 2002). Así, se ha demostrado que la vía de señalización dependiente de AMPc/PKA/CREB está implicada en la formación de potenciaciones a largo plazo (LTP). Asimismo, la fosforilación de CREB se ha involucrado en procesos de neuroprotección (Walton y col., 1999). Es razonable pensar, por tanto, que la reducción del p-CREB sería parcialmente responsable de los déficits cognitivos característicos de la EA.

Basándonos en los hallazgos bioquímicos obtenidos, utilizamos el presente modelo de EA para examinar si la minociclina podría proteger a la corteza temporal, previniendo las alteraciones del sistema somatostatinérgico provocados por el A β (25-35). La minociclina es una tetraciclina semisintética de segunda generación que se emplea en clínica como antibiótico de amplio espectro, siendo eficaz en el tratamiento de infecciones resistentes a otros fármacos. Además, se ha descrito que este antibiótico posee propiedades antiinflamatorias (Amin y col., 1996), por lo que también se utiliza para el tratamiento del acné, de la artritis reumatoide y de la osteoartritis (Smilack, 1999). Es una molécula altamente lipofílica que atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica (MacDonald y col., 1973; Aronson, 1980). (Figura 41). Actualmente, numerosos autores han sugerido que la minociclina podría ejercer un efecto neuroprotector en varios modelos animales de trastornos neurológicos tales como la isquemia cerebral (Yrjänheikki y col., 1999), la esclerosis lateral amiotrófica (Zhu y col., 2002; Zhang y col., 2003), la enfermedad de Huntington (Chen y col., 2000; Wang y col., 2003) y la enfermedad de Parkinson (Du y col., 2001; Wu y col., 2002), atenuando su gravedad. Forloni y col. (2001) describieron que las tetraciclinas presentan actividad anti-amiloidogénica *in vitro*, siendo capaces de inhibir la formación de agregados amiloideos y de desensamblar fibrillas preformadas. Posteriormente, se



demostró que la minociclina inhibe la activación microglial y la muerte neuronal inducida por el A β en el hipocampo de la rata (Ryu y col., 2004). Recientemente, Hunter y col. (2004(a) y (b)) han demostrado que en los ratones Ts65Dn, otro modelo experimental de la EA, la minociclina aminora significativamente la pérdida de fibras colinérgicas y atenua el daño cognitivo que parece ser una consecuencia funcional de la pérdida selectiva de neuronas colinérgicas. Sin embargo, no hallamos ningún estudio acerca de si la minociclina protege al sistema receptor-efector de la SRIF, también implicado en el aprendizaje y la memoria, del A β (25-35).

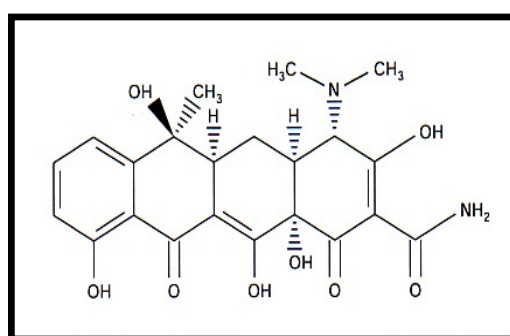


Figura 41. Estructura química de la minociclina.

Cuando se administró la minociclina a ratas tratadas de forma continua con el A β (25-35), se normalizó el contenido de SRIF-IR en la corteza temporal de la rata. Consistente con este resultado, esta tetracyclina restauró tanto los niveles de ARNm de la SRIF como los niveles proteicos del p-CREB a los valores control en éste área cerebral. La minociclina administrada sola a ratas control indujo un aumento significativo del contenido de SRIF-IR y de ARNm de la SRIF. Además, provocó un aumento no solo en los niveles de p-CREB sino también en los niveles de CREB total, sugiriendo que la minociclina no solo aumenta el grado de fosforilación de CREB sino también su síntesis. Se ha demostrado que la fosforilación de la proteína CREB está regulada por una gran variedad de vías de señalización celular, implicadas en procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación. Así, se ha descrito que las proteínas MAPK y ERK activan la proteína CREB, reduciendo de este modo la apoptosis en células de neuroblastoma humano (Park y Cho, 2006). Por otro lado, la vía de señalización de la Akt, una serina/treonina quinasa de tipo B, modula la integridad y supervivencia celular mediante la activación de varios sustratos, entre los que cabe destacar CREB (Chong y col., 2005). Un estudio reciente realizado por Pi y col. (2004) ha demostrado que la minociclina aumenta la fosforilación de Akt,



desencadenada por la vía de señalización de la fosfoinositido-3 quinasa (PI 3-K) en neuronas granulares del cerebelo. De estos datos inferimos que en la corteza temporal, la minociclina podría aumentar el grado de fosforilación de CREB a través de esta vía de señalización, lo que conduciría al aumento de SRIF-IR. Así, la minociclina podría prevenir las alteraciones del contenido de SRIF y de su ARNm inducidos por el A β (25-35). Aunque los efectos de la minociclina sobre las funciones cerebrales están aún sin definir, la potenciación de las vías de señalización dependientes de CREB inducida por la minociclina sugiere que esta tetraciclina podría ser beneficiosa para mejorar la función neuronal y, por ende, podría ser útil en el tratamiento paliativo de los déficits cognitivos presentes en la EA. En apoyo a esta hipótesis, se ha observado una mejoría sustancial de las funciones cognitivas en ratones transgénicos PPA-tg tras la administración de minociclina (Seabrook y col., 2006)

Recientemente, se ha descrito que la SRIF regula la actividad de la neprilisina, una endopeptidasa neutra involucrada en la degradación del A β en el cerebro, modulando tanto su nivel de expresión como su localización sináptica (Saito y col., 2005). En vista de la reducción de SRIF-IR inducida por el A β (25-35) en la corteza temporal de la rata, nos planteamos si esta alteración modificaría la expresión de la neprilisina. Después de la administración continua del A β (25-35), se observó una reducción significativa en los niveles proteicos de neprilisina en esta área cerebral. Este hallazgo está en concordancia con el hecho de que en los estadios tempranos de la EA, los niveles de ARNm de la neprilisina están disminuidos, tanto en la corteza temporal como en el hipocampo de estos pacientes (Yasojima y col., 2001). Iwata y col. (2000; 2001) han constatado que una reducida actividad de la neprilisina conduce a una acumulación del A β en el cerebro, mientras que el aumento de dicha actividad reduce los niveles del A β , tanto en su forma soluble como en su forma fibrilar en ratones transgénicos (Leissring y col., 2003). Existe, por consiguiente, una correlación estrecha y coherente entre la disminución del contenido de SRIF-IR y la reducción de los niveles proteicos de neprilisina inducida por el A β (25-35). Hay que precisar que la reducción de neprilisina y, por ende, de su actividad, potenciaría aún más los efectos negativos del A β (25-35) sobre la transmisión somatostatinérgica, al conducir a una mayor acumulación del A β . Estos acontecimientos generarían un círculo vicioso que conduciría a una acumulación catastrófica del A β en el cerebro. Es interesante destacar que la administración de minociclina a ratas tratadas con el A β (25-35) evitó la reducción en los niveles de la neprilisina en la corteza temporal mientras que en ratas control, esta tetraciclina indujo un aumento de dichos niveles, consistente con el aumento de SRIF-IR provocado por la



minociclina. El conjunto de estos hallazgos nos permite concluir que la minociclina podría ejercer un cierto efecto neuroprotector a través de la modulación de la neprilisina, vía el aumento de SRIF, regulando así el metabolismo del A β .

Diversos autores sugieren que el locus de los déficits de señalización celular en la EA reside a nivel de la interacción “receptor-proteína G” (Fowler y col., 1995). En nuestro estudio, la infusión continua del A β (25-35) provocó una disminución del número total de receptores de SRIF en la corteza temporal de la rata, comparable al observado en otras áreas corticales estudiadas. Este resultado extiende con estudios previos en cerebro postmortem de pacientes con EA (Krantic y col., 1992). Este efecto del A β (25-35) es específico de área puesto que en el hipocampo, dicho péptido no alteró la densidad de los receptores de SRIF, aunque sí algunos componentes de la vía de transducción de la señal. Demostramos aquí que la disminución en la unión de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SRIF-14 a sus receptores en respuesta al A β (25-35) es consecuencia de una reducción selectiva en la expresión del subtipo sst2, como evidencia la reducción en los niveles de ARNm del sst2 así como en los niveles proteicos del mismo. Los subtipos sst2 y sst4 son los que se expresan principalmente en la corteza cerebral e hipocampo, siendo el sst2 el que se expresa mayoritariamente en la corteza cerebral de la rata. Aunque el significado funcional de esta reducción selectiva se desconoce, tiene interés dada la implicación de sst2 en el control de la actividad motora (Viollet y col., 2000) y del aprendizaje espacial (Dutar y col., 2002). El sst2 es el único subtipo de receptor de SRIF que contiene el elemento CRE en la región promotora del gen. Por consiguiente, su transcripción puede ser regulada por la vía del AMPc/PKA/CREB. Dado que la administración crónica del A β (25-35) indujo una disminución en los niveles proteicos de p-CREB en la corteza temporal, concluimos que la reducción del sst2 es atribuible, al menos en parte, a una reducción en la tasa de transcripción del gen.

Existen otras vías que podrían contribuir a la reducción del sst2 inducida por el A β (25-35). Dado que el número de receptores presentes en la superficie celular está en función de los procesos combinados de aparición de receptores recién sintetizados en la membrana plasmática y de la tasa de internación de los mismos, un mecanismo plausible sería una alteración en la desensibilización de los receptores de SRIF por el A β (25-35). Las GRKs son las principales responsables de iniciar la desensibilización y posterior internación de los receptores acoplados a proteínas G. Se conocen hasta la fecha siete isoformas de esta familia de serina/treonina quinasas, denominadas GRK1-GRK7. De éstas, la GRK1 y la GRK7 se expresan casi exclusivamente en retina mientras que GRK2, GRK3, GRK5 y GRK6 se expresan de forma



ubicua, incluyendo el cerebro, sugiriendo que juegan un papel importante en la transducción de señales en neuronas (Kohout y Lefkowitz, 2003). Nuestro estudio se centró en medir la isoforma GRK2, la principal isoforma en la corteza cerebral (Erdtmann-Vourliotis y col., 2001). Demostramos aquí por primera vez una relación estrecha entre A β y GRKs. Mediante inmunodetección, detectamos un aumento significativo en los niveles proteicos de la GRK2 en la corteza temporal de ratas tratadas de forma continua con el A β (25-35). Proponemos que al aumentar los niveles de GRK2, aumentaría la disponibilidad de esta quinasa en la membrana plasmática y, por ende, la interacción GRK2-sst2, lo que conduciría a una mayor desensibilización e internación de dicho receptor. A favor de esta hipótesis, Tulipano y col. (2004) demostraron recientemente que en células HEK 293, la internación del sst2A es dependiente de la fosforilación mediada por GRK2 de residuos de serina y treonina presentes en el extremo C-terminal del receptor. Además, observaron que la sobre-expresión de GRK2 promueve un incremento en la fosforilación del sst2A y facilita el reclutamiento de las β -arrestinas. Sin embargo, la fosforilación del sst3 inducida por agonistas era independiente de GRK2 mientras que ni el sst1 ni el sst4 exhibieron fosforilación, ni en presencia ni en ausencia de GRK2. El aumento de GRK2 que observamos en respuesta al A β (25-35) podría tener consecuencias adicionales en la célula cortical puesto que proteínas citoesqueléticas como la tubulina así como proteínas intracelulares de la familia de la sinucleína son también fosforiladas por la GRK2 (Pitcher y col., 1998; Carman y col., 1998; Pronin y col., 2000).

Diversos autores han constatado que los niveles de ARNm de las diferentes isoformas de GRKs están alterados en numerosas patologías (Gainetdinov y col., 2004; Suo y col., 2004; Penela y col., 2006), aunque la regulación de la transcripción de los correspondientes genes aún no se conoce con claridad. Sin embargo, Ramos-Ruiz y col. (2000) han demostrado que la vía de señalización de la PKC regula a la alta la transcripción de GRK2 en células cardiovasculares. En nuestro estudio, la administración de minociclina restauró tanto los niveles de ARNm del sst2 como los niveles proteicos del sst2 y de GRK2 a los valores control en la corteza temporal de ratas tratadas con el A β (25-35). Los trabajos realizados recientemente por Nikodemova y col. (2006) sugieren que la minociclina inhibe la PKC en la microglia. Por consiguiente, es razonable especular que en la corteza temporal, la minociclina podría normalizar los niveles de GRK2 a través de la modulación de la PKC, permitiendo así restaurar los niveles del sst2 a los valores control.



Alternativamente, la disminución del sst2 inducida por el A β (25-35) podría estar relacionada con la liberación de algunas citoquinas proinflamatorias que contribuyen a la patogénesis de la EA. En este sentido, se sabe que la activación microglial provoca efectos citotóxicos a través de la liberación de mediadores potencialmente nocivos, tales como la interleukina-1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el óxido nítrico (NO), los cuales participan en procesos de neurodegeneración (Chao y col., 1992; Giulian y Corpuz, 1993; Banati, 1993; Liu y Hong, 2003). Asimismo, Heneka y col. (2002) observaron que la inyección intracortical del A β (1-42) agregado induce una respuesta inflamatoria que implica la expresión microglial de la NOS inducible (iNOS) y de IL-1 β . Recientemente, se ha demostrado que el tratamiento de células endoteliales coronarias con el TNF- α conduce a una disminución dosis-dependiente del ARNm y de los niveles proteicos del subtipo sst2. Por lo tanto, es tentador especular que la liberación de TNF- α por las células gliales podría conducir a una regulación a la baja del sst2 en la corteza temporal de la rata. La administración de minociclina previno la disminución del sst2 inducida por el A β (25-35) en la corteza temporal de la rata. Varios autores han descrito que la minociclina inhibe la activación microglial, reduciendo así la liberación o producción de IL-1 β , TNF- α y NO, lo que argumenta a favor de la hipótesis planteada. El conjunto de estos resultados sugiere que la minociclina podría prevenir las alteraciones provocada por el A β (25-35) sobre los receptores de SRIF mediante la reducción de TNF- α .

Finalmente, observamos que la administración del A β (25-35) no alteró ni la actividad AC basal ni la actividad AC estimulada por FK en la corteza temporal de la rata a diferencia de lo que sucede en el hipocampo. Sin embargo, la capacidad de la SRIF para inhibir ambas actividades fue significativamente menor con respecto al grupo control. Dado que la FK actúa sobre la subunidad catalítica de la AC, esto sugiere que la disminuida sensibilidad de la AC a la inhibición por SRIF no se debe a alteraciones en dicha subunidad. Por otro lado, los análisis de inmunodetección de las proteínas Gi α 1, Gi α 2 y Gi α 3 demostraron que los niveles proteicos de dichas proteínas no se modifican en respuesta al A β (25-35). Estos resultados, concuerdan con los estudios previos en la corteza temporal de pacientes con EA donde tampoco se observaron cambios a nivel de la proteína Gi α 2 (Kato y col., 1991). Por consiguiente, es altamente probable que la atenuada capacidad de la SRIF de inhibir la actividad AC sea consecuencia directa de la reducción del número de receptores de SRIF. Asimismo, la administración de la minociclina a ratas tratadas con el A β (25-35) no alteró ni la actividad AC basal ni la actividad enzimática

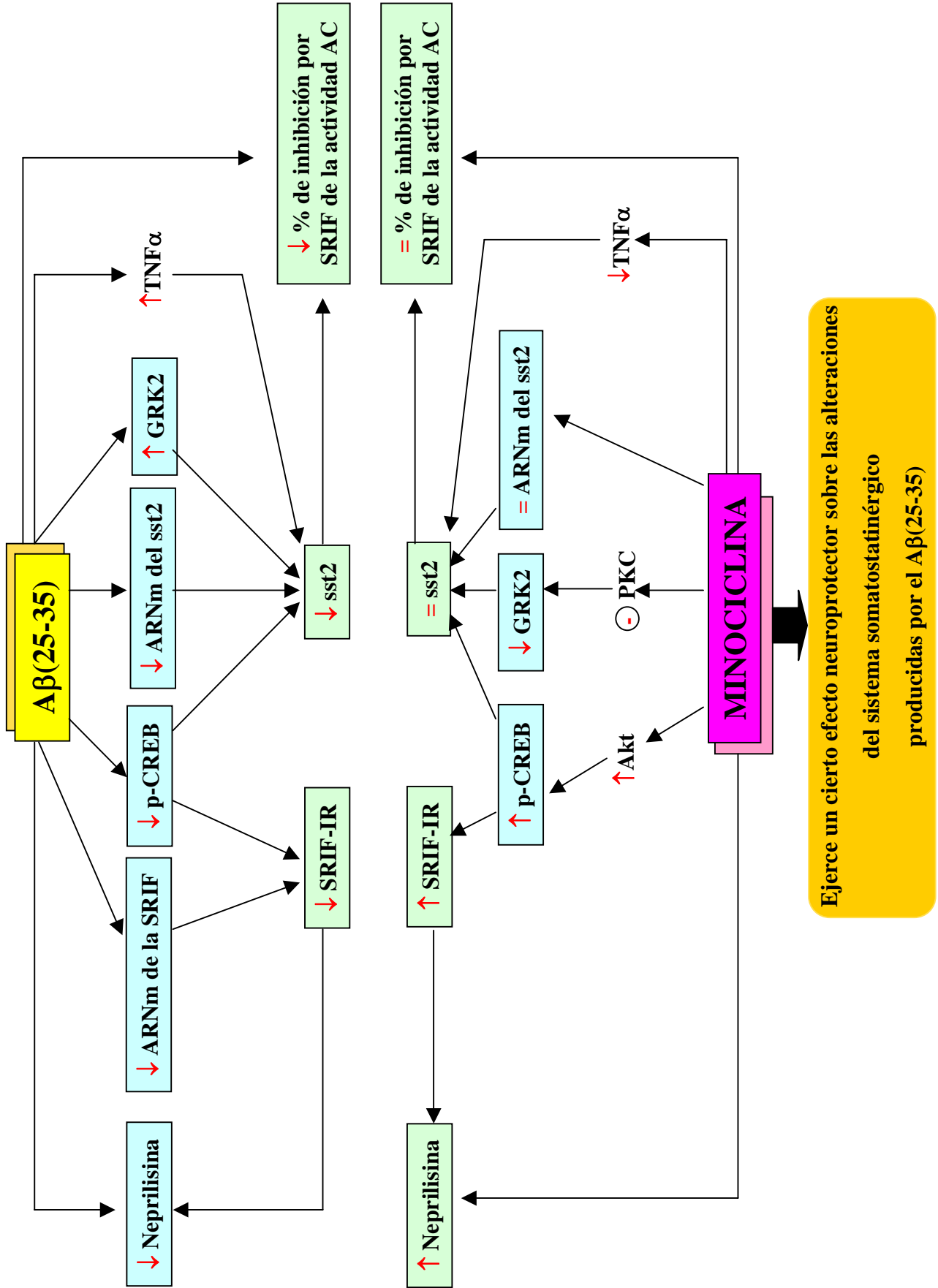


estimulada por FK en la corteza temporal de la rata. Este resultado es consistente con un estudio previo realizado en la corteza cerebral de la rata en el que se demuestra que la minociclina no ejerce ningún efecto sobre la producción basal o estimulada por FK del segundo mensajero AMPc (Mork y Geisler, 1993). Sin embargo, observamos que este tratamiento previno la disminución del efecto inhibitor de la SRIF sobre la actividad AC inducida por el A β (25-35) en la corteza temporal de la rata. Este efecto preventivo de la minociclina es probablemente atribuible a su capacidad de bloquear la reducción del número de receptores de SRIF inducida por el A β (25-35).

En resumen, dadas las potentes propiedades amnésicas atribuidas a este fragmento de 11 aminoácidos del A β (Olariu y col.,2001; Yamaguchi y Kawashima, 2001) y el papel de la SRIF en procesos de aprendizaje (Vécsei y col., 1984; Cacabelos y col., 1988), sugerimos que la reducción de sst2 y de la SRIF-IR en la corteza temporal en respuesta al A β (25-35) podría estar involucrado en los déficits cognitivos descritos tanto en este modelo animal de la EA como en pacientes con dicha enfermedad. Además los presentes resultados demuestran que la minociclina protege al sistema somatostatinérgico de las alteraciones provocadas por el A β (25-35) en la corteza temporal de la rata. Dado que se ha observado que la minociclina mejora el déficit cognitivo en ratones transgénicos PPA-tg y que la SRIF facilita los procesos de aprendizaje y memoria, nuestros hallazgos refuerzan la idea de que el efecto protector de la minociclina sobre los procesos cognitivos alterados en la EA podría deberse, en parte, a la protección del sistema somatostatinérgico.



Resumen de los efectos del Aβ(25-35) y de la minociclina sobre el sistema somatostatínrgico en la corteza temporal de la rata.





4. Efecto de la sulfadiazina sobre las alteraciones del sistema somatostatinérgico provocadas por el A β (25-35) en la corteza temporal de la rata.

Las sulfamidas fueron el primer grupo de agentes antibacterianos sintéticos, eficaces en el tratamiento de infecciones en la especie humana. El prontosil fue la primera de estas sulfamidas estudiada por Domagk en 1935. Las sulfamidas derivan del ácido sulfanílico y poseen dos átomos de nitrógeno, el N₁ amídico y el N₄ amínico. En el caso de las sulfamidas de acción corta, uno de los átomos de hidrógeno unido al N₁ es sustituido por un heterociclo de pirimidina, formando así la 2-(p-amino-benceno-sulfamido-)pirimidina ó sulfadiazina (Figura 42). Este antibiótico se emplea en clínica especialmente para el tratamiento de la toxoplasmosis, así como para el tratamiento de infecciones urinarias y respiratorias. Se absorbe con rapidez en el estómago e intestino y puede atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica (Kemali y col., 1963).

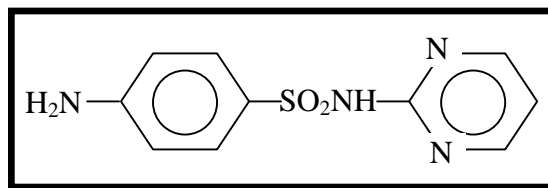


Figura 42. Estructura química de la sulfadiazina

En el año 1958, Hackmann, trabajando en el laboratorio de Domagk, demostró que la administración de la sulfadiazina ejercía una influencia favorable sobre el envejecimiento en perros y ratas. Más tarde, Becker (1959) observó que la sulfadiazina aumentaba las capacidades físicas y psíquicas en ancianos. Asimismo, Ravina y Hackmann (1967) observaron posteriormente que la administración de la sulfadiazina a ancianos de entre 82 y 92 años provocaba una mejoría en sus facultades intelectuales.

Como ya se ha expuesto anteriormente, el A β es un péptido neurotóxico que provoca estrés oxidativo, una respuesta inflamatoria y altera el equilibrio homeostático en las neuronas y células gliales (Varadarajan y col., 2000; Mc Geer y Mc Geer, 2003). Se ha observado que este péptido afecta más a la corteza temporal y frontal que a la corteza parietal u occipital en pacientes con EA (Selkoe, 2001; Masters y Beyreuther, 2005).



Actualmente, Sparey y col. (2005) han desarrollado derivados de sulfamidas que son potentes inhibidores de la γ -secretasa. Esta enzima escinde el fragmento intramembranoso carboxilo-terminal C99, resultante de la hidrólisis de la PPA por la β -secretasa, generando así el A β , que se libera al espacio extracelular. Se ha postulado que un nivel anormalmente alto del A β en el cerebro es el principal desencadenante de la EA (Hardy y Selkoe, 2002). Shaw y col. (2006) han observado que ciertos derivados de las sulfamidas reducen significativamente los niveles cerebrales del A β en ratones transgénicos PPA-tg, lo que sugiere que estos fármacos podrían ser útiles en el tratamiento de la EA.

Por consiguiente, en base a todas estas evidencias y dado que anteriormente hemos demostrado que el péptido A β (25-35) disminuye la actividad del sistema somatostatinérgico en diversas áreas cerebrales, incluyendo la corteza temporal, nos pareció de gran interés analizar si la sulfadiazina podría proteger a la corteza temporal de la rata de dichas alteraciones.

Existe una correlación estrecha entre la patología de la EA y acontecimientos neuroinflamatorios. Numerosas evidencias sugieren que el A β activa las células gliales, estimulando la producción de sustancias inflamatorias tales como citoquinas, entre las que cabe destacar la IL-1 β , IL-2 e IL-6, que provocan neurodegeneración (Meda y col., 1995; Klegeris y Mc Geer, 1997; Yates y col., 2000). Se ha detectado la presencia de estas interleuquinas en el cerebro de pacientes con EA (Singh, 1994) así como en cultivos primarios de células gliales procedentes de ratas tratadas con el A β (25-35) (Toro y col., 2001; Masilamoni y col., 2003). La IL-2 es producida en el SNC por células gliales, y se han detectado receptores de IL-2 en la corteza cerebral de la rata (Araujo y col., 1989). El trabajo realizado por Araujo y Cotman, (1995) sugiere que la acumulación de IL-2 en el SNC no solo altera la supervivencia de las poblaciones neuronales, sino que también puede interferir el funcionamiento de algunos neurotransmisores (Araujo y col., 1989; Hanisch y col., 1993; Lapchak y Araujo 1993). En la EA, la activación de células gliales ocurre alrededor de las PNS (Dickson y col., 1993), creando un microambiente que favorece significativamente la síntesis y la liberación de IL-2 (Kittur y col., 1990). Jin y col. (2005) han demostrado recientemente que la infusión del A β (25-35) también promueve la activación de células gliales, causando una fuerte reacción inflamatoria caracterizada por un aumento en la producción de interleuquinas.

En el presente estudio, la infusión continua del A β (25-35) provocó una disminución del contenido de SRIF-IR en la corteza temporal de la rata. Se ha demostrado que la IL-2, cuya producción está aumentada por el A β (25-35), estimula la liberación de SRIF en células



somatostatinérgicas del hipotálamo (Karanth y col., 1993). Por lo tanto, podemos sugerir, que el A β (25-35) podría disminuir los niveles de SRIF-IR de una manera indirecta mediante la estimulación de la liberación de IL-2. La administración de la sulfadiazina con el A β (25-35) previno parcialmente la disminución del contenido de SRIF-IR la corteza temporal. En línea con esta hipótesis, se ha demostrado recientemente que derivados de sulfamidas se unen a la IL-2, bloqueando así la unión de la citoquina a sus receptores específicos y, por ende, impidiendo su acción neurotóxica (Braisted y col., 2003; Waal y col., 2005).

La infusión continua del A β (25-35) también provocó, por otro lado, una disminución del número de receptores de SRIF en la corteza temporal de la rata. Los ensayos de inmunodetección de los distintos subtipos de sst revelaron que dicha disminución afectaba selectivamente al subtipo sst2, que se expresa mayoritariamente en la corteza cerebral de la rata (Pérez y col., 1994). Dado que el A β (25-35) aumenta la liberación de IL-2 y ésta, a su vez, aumenta la liberación de SRIF, es pausable que la mayor concentración de SRIF extracelular pueda inducir una regulación a la baja del sst2. Hay numerosas evidencias de que la SRIF contribuye significativamente a la regulación de la expresión de sus receptores (Csaba y col., 2002). Además en ratones *knockout* para la SRIF, se observó un incremento en los niveles cerebrales de los receptores de SRIF y, en particular, del subtipo sst2 (Ramirez y col., 2002), lo que argumenta a favor de esta hipótesis. El tratamiento con sulfadiazina revirtió, el número de receptores de SRIF y los niveles del sst2 a los valores control, posiblemente debido a su capacidad de revertir la reducción de SRIF-IR a través de su unión a IL-2.

Observamos que la administración del A β (25-35), de sulfadiazina o de sulfadiazina más A β (25-35) no alteró ni la actividad AC basal ni la actividad AC estimulada por FK en la corteza temporal de la rata. Sin embargo, la administración de sulfadiazina y del A β (25-35) previno parcialmente la reducción en la capacidad de la SRIF para inhibir la actividad AC en la corteza temporal de la rata, provocada por la infusión continua del A β (25-35). Los análisis de inmunodetección de las proteínas Gi α 1, Gi α 2 y Gi α 3 demuestran que los niveles de dichas proteínas no se alteran en respuesta al A β (25-35), sulfadiazina o sulfadiazina más A β (25-35). Por consiguiente, es altamente probable que la atenuada sensibilidad de la AC a la SRIF sea debido a la disminución del número de receptores de SRIF. Dado que el pretratamiento con sulfadiazina protege a la corteza temporal de la reducción en sst2, se reestablecería así a los valores control la capacidad inhibitoria de la SRIF sobre la AC.



El conjunto de estos hallazgos sugiere que la sulfadiazina podría prevenir, al menos en parte, las alteraciones del sistema somatostatinérgico inducidas por el A β (25-35) mediante su unión a la IL-2, impidiendo así su acción neurotóxica.

En base a los resultados observados en este modelo animal de la EA es tentador especular que la sulfadiazina podría ejercer un efecto beneficioso en el tratamiento de los déficits cognitivos presentes en la EA.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. La administración intracerebroventricular del péptido β -amiloide (25-35) disminuye la actividad del sistema somatostatinérgico en el hipocampo y en la corteza frontal, parietal y temporal de la rata de una manera dependiente del tiempo, siendo su efecto más acusado después de su infusión continua que de la administración aguda.
2. El péptido β -amiloide (25-35) provoca una reducción del número de receptores de somatostatina en las distintas áreas corticales estudiadas pero no altera estos receptores en el hipocampo de la rata. Asimismo, la disminución del contenido de somatostatina inmunorreactiva es mayor en la corteza temporal que en el resto de las áreas cerebrales. Por lo tanto, estos efectos del péptido β -amiloide (25-35) muestran una especificidad regional.
3. En el hipocampo de la rata, la atenuada sensibilidad de la adenilato ciclasa al efecto inhibidor de la somatostatina, inducida por el péptido β -amiloide (25-35), es debido a una reducción en la actividad de dicha enzima. Esta menor actividad enzimática de la adenilato ciclasa es consecuencia de una menor expresión de la isoforma AC I.
4. El péptido β -amiloide (25-35) induce una disminución del contenido de somatostatina inmunorreactiva y de los niveles de p-CREB en el hipocampo de la rata. Estos datos sugieren que la disminución de somatostatina inmunorreactiva podría atribuirse a una menor tasa de transcripción del gen de la SRIF. Además, tanto la reducción en la actividad adenilato ciclasa como en la expresión de AC I inducido por el péptido β -amiloide (25-35) explicaría la menor fosforilación de la proteína CREB.



5. En la corteza frontal y parietal de la rata, el péptido β -amiloide (25-35) disminuye el contenido tisular de somatostatina inmunorreactiva, el número de receptores de somatostatina y el efecto inhibitor de la misma sobre la actividad adenilato ciclasa. Este menor efecto inhibitor de la somatostatina sobre la adenilato ciclasa no se debe a una alteración de la subunidad catalítica de la enzima ni a una menor expresión de las proteínas Gi sino que es probablemente una consecuencia directa de la disminución del número de receptores de somatostatina.
6. La infusión crónica del péptido β -amiloide (25-35) disminuye la unión del $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SRIF-14 a sus receptores en la corteza temporal de la rata. Esta reducción se debe a una disminución selectiva de la expresión del sst2, como evidencia la reducción de sus niveles de ARNm y de sus niveles proteicos. La disminución en los niveles de p-CREB provocados por el péptido β -amiloide (25-35) sugiere que la menor expresión del sst2 se debe, al menos en parte, a una menor tasa de transcripción de su gen.
7. La reducción del sst2 inducida por el péptido β -amiloide (25-35) en la corteza temporal se correlaciona con un aumento en los niveles proteicos de la enzima GRK2. Esto sugiere que la reducción del sst2 podría también atribuirse parcialmente a una mayor desensibilización e internación del receptor.
8. En la corteza temporal de la rata, el péptido β -amiloide (25-35) induce una reducción del contenido de somatostatina inmunorreactiva que se correlaciona con la reducción en los niveles de p-CREB, sugiriendo que el menor contenido de somatostatina podría deberse a una disminución en la tasa de transcripción de su gen.
9. La administración del péptido β -amiloide (25-35) no altera la actividad adenilato ciclasa basal ni estimulada por forskolina, pero sí conduce a una disminución del efecto inhibitor de la somatostatina sobre dichas actividades. Esta atenuada sensibilidad de la adenilato ciclasa a la somatostatina no implica una alteración de la subunidad catalítica de la enzima ni una menor expresión de las proteínas Gi sino que es probablemente el resultado de la disminución del número de receptores de somatostatina.



10. La administración de minociclina previene la disminución del contenido de neprilisina y de somatostatina inmunorreactiva provocada por el péptido β -amiloide (25-35) en la corteza temporal de la rata. Dado que la somatostatina aumenta la actividad de la neprilisina y esta molécula es la principal enzima encargada de la degradación del péptido β -amiloide, es posible que la minociclina, al prevenir la disminución de los niveles de somatostatina inmunorreactiva restaure, la actividad de la neprilisina evitando así la acumulación del péptido β -amiloide.

11. Dado que el péptido β -amiloide (25-35) deteriora los procesos de memoria y aprendizaje mientras que la somatostatina los facilita, los presentes resultados sugieren que la disminución de la actividad del sistema somatostatinérgico en el hipocampo y corteza cerebral de la rata podría estar implicada en las alteraciones cognitivas descritas en este modelo animal de la enfermedad de Alzheimer. Además, el hecho de que la minociclina y la sulfadiazina previenen las alteraciones del sistema somatostatinérgico inducidas por dicho péptido en la corteza temporal sugiere que ambos fármacos podrían tener un efecto beneficioso sobre los trastornos cognitivos presentes en la enfermedad de Alzheimer.

ARTÍCULOS PUBLICADOS



ARTÍCULOS PUBLICADOS

El trabajo presentado ha dado lugar a las siguientes publicaciones internacionales:

- A. Hervás-Aguilar, L. Puebla-Jiménez, **E. Burgos-Ramos**, D. Aguado-Llera y E. Arilla-Ferreiro. “ Effects of single and continuous administration of amyloid β -peptide (25-35) on adenylyl cyclase activity and the somatostatinergic system in the rat frontal and parietal cortex”. *Neuroscience* (2005) 135: 181-190.
- **Burgos-Ramos E.**, Hervás-Aguilar A., Puebla-Jiménez L., Boyano-Adánez M.C. y Arilla-Ferreiro E.” Chronic but not acute intracerebroventricular administration of amyloid beta (25-35) decreases somatostatin content, adenylate cyclase activity, somatostatin-induced inhibition of adenylate cyclase activity and adenylate cyclase I levels in the rat hippocampus”. *Journal of Neuroscience Research* (2006) (En prensa).
- **Burgos-Ramos E.**, Puebla-Jiménez L. y Arilla-Ferreiro E. “Minocycline protects somatostatin receptor-effector system in the temporal cortex of β -amyloid-treated rats” . *Molecular Pharmacology* (2006) (Enviado).
- **Burgos-Ramos E.**, Puebla-Jiménez L. y Arilla-Ferreiro E. “Minocycline prevents β -amyloid-impaired CREB phosphorylation and the reduction of somatostatin and neprilysin content in the temporal cortex in a rat model of Alzheimer’s disease model rat”. *European Journal of Neuroscience* (2006) (Enviado).
- **Burgos-Ramos E.**, Puebla-Jiménez L. y Arilla-Ferreiro E. “Sulfadiazine partially protects the rat temporal cortex from amyloid β peptide (25-35)-induced alterations of the somatostatinergic system”. *Cortex* (2006) (Enviado).

BIBLIOGRAFÍA

**BIBLIOGRAFÍA**

- Alderton F., Fan T.P. y Humphrey P.P.** Somatostatin receptor-mediated arachidonic acid mobilization: evidence for partial agonism of synthetic peptides. **Br J Pharmacol** (2001) 132: 760-766.
- Alonso A.D., Grundke-Iqbal I., Barra H.S. y Iqbal K.** Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubule by the abnormal tau. **Proc Natl Acad Sci USA** (1997) 94: 298-303.
- Alvaro I. y Arilla E.** Somatostatin receptor elevation in rat striatum after diisopropylfluorophosphate administration. **Brain Res Bull** (1992) 28: 513-518.
- Amin A.R., Attur M.G., Thakker G.D., Patel P.D., Vyas P.R., Patel R.N., Patel I.R. y Abramson S.B.** A novel mechanism of action tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. **Proc Natl Acad Sci USA** (1996) 93: 14014-14019.
- Araujo D.M., Lapchak P.A., Collier B. y Quirion R.** Localization of interleukin-2 immunoreactivity and interleukin-2 receptors in the rat brain: interact with the cholinergic system. **Brain Research** (1989) 498: 257-266.
- Araujo D.M. y Cotman C.W.** Differential effects of interleukin-1 β and interleukin-2 on glia and hippocampal neurons in culture. **Int J Devl Neurosci** (1995) 13: 201-212.
- Arendt T.** Disturbance of neuronal plasticity is a critical pathogenetic event in Alzheimer's disease. **Int J Dev Neurosci** (2001) 19: 231-241.
- Aronson A.L.** Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. **J Am Vet Med Assoc** (1980) 176: 1061-1068.
- Arriagada P.V., Growdon J.H., Hedley-Whyte E.T. y Hyman B.T.** Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. **Neurology** (1992) 42: 631-639.
- Ávila J., Lucas J.J., Pérez M. y Hernández F.** Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. **Physiol Rev** (2004) 84: 361-384.
- Bakst I., Avendano C., Morrison J.H. y Amaral D.G.** An experimental analysis of the origins of somatostatin-like immunoreactivity in the dentate gyrus of the rat. **J Neurosci** (1986) 6: 1452-1462.
- Banati RB.** Neuropathological imaging: in vivo detection of glial activation as a measure of disease and adaptive change in brain. **Br Med Bull** (1993) 65: 121-131.
- Barber D.L., McGuire M.E. y Ganz M.B.** β -adrenergic and somatostatin receptors regulate Na⁺/H⁺ exchange independent of cAMP. **J Biol Chem** (1989) 264: 21038-21042.
- Barrios V., Rodríguez-Sánchez M.N. y Arilla E.** The effect of chronic administration of nicotine and withdrawal on somatostatin concentration and binding in brain of rat. **Neuropharmacology** (1990) 29: 1025-1030.
- Barton J.J.** Disorders of face perception and recognition. **Neuron Clin** (2003) 21: 521-548.
- Bauemeister H. y Meyerhof W.** Gene regulation of somatostatin receptors in rats. **J Physiol (Paris)** (2000) 94: 167-177.
- Bauemeister H., Kreuker O.J., Roosterman D., Shafer J. y Meyerhof W.** Cloning, expression, pharmacology and tissue distribution of the mouse somatostatin receptor subtype 5. **J Neuroendocrinol** (1998) 10: 283-290.
- Beal M.F., Mazurek M.F., Tran V.T., Chattha G., Bird E.D. y Martin J.B.** Reduced numbers of somatostatin receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. **Science** (1985) 229: 289-291.
- Becker A.** Beobachtungen über debenal in der geriatric. **Münich Mediz Wrschr** (1959) 73: 1737-1741.
- Bergström L., Garlind A., Nilsson L., Alafuzoff I., Fowler C.J., Windblad B. y Cowburn R.F.** Regional distribution of somatostatin binding and modulation of adenylyl cyclase activity in Alzheimer's disease brain. **J Neurol Sci** (1991) 105: 225-233.
- Berridge M.J.** Inositol trisphosphate and calcium signalling. **Nature** (1993) 361: 315-325.
- Birnbaumer L., Abramowitz J., Ytatani A., Okabe K., Mattera R., Graf R., Stanford J. y Brown A.M.** Roles of G-proteins in coupling of receptors to ion channels and other effector systems. **Biochem Molec Biol** (1990) 25: 225-244.



- Bourtchuladze R., Frenquelli B., Blendy J., Cioffi D., Schutz G. y Silva A.J.** Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* (1994) 79: 59-68.
- Braak H. y Braak E.** Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* (1991) 82: 239-259.
- Braisted A.C., Oslob J.D., Delano W.L., Hyde J., McDowell R.S., Waal N., Yu C., Arkin M.R. y Raimundo B.C.** Discovery of a potent small molecule IL-2 inhibitor through fragment assembly. *J Am Chem Soc* (2003) 125: 3714-3715.
- Brown M., Rivier J. y Vale W.** Somatostatin: analogs with selected biological activities. *Science (Washington D.C.)* (1977) 196: 1467-1468.
- Bruno J.F., Xu Y., Song J. y Berelowitz M.** Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89: 11151-11155.
- Bruno J.F., Xu Y., Song J. y Berelowitz M.** Pituitary and hypothalamic somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in the food-deprived and diabetic rat. *Endocrinol* (1994) 135: 1787-1792.
- Bruno J.F., Xu Y., Song J. y Berelowitz M.** Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinol* (1993) 133: 2561-2567.
- Buchet R., Tavitian E., Ristig D., Swoboda R., Stauss U., Gremlich H.U., De La Fournier L., Stauffienbiel M., Frey P y Lowe D.A.** Conformations of synthetic beta peptides in solid state and aqueous solution: relation to toxicity in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* (1996) 1315: 40-46.
- Cacabelos R., Niigawa H., Rodríguez-Arno M.D., Gomez-Pan A. y Nishimura T.** Influence of somatostatin and growth hormone-releasing factor on behaviour. *Horm Res* (1988) 29: 129-132.
- Carman C.V., Som T., Kim C.M. y Benovic J.L.** Binding and phosphorylation of tubulin by G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* (1998) 273: 20308-20316.
- Chao C.C., Hu S., Molitor T.W., Shaskan E.G. y Peterson P.K.** Activated microglia mediate cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* (1992) 149: 2736-2741.
- Chen C.** Beta-amyloid increases dendritic Ca^{2+} influx by inhibiting the A-type K^{+} current in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) 338: 1913-1914.
- Chen M., Ona V.O., Li M., Ferrante R.J., Fink K.B., Zhu S., Bian J., Guo L., Farrell L.A., Hersch S.M., Hobbs W., Vonsattel J.P., Cha J.H. y Friedlander R.M.** Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* (2000) 6: 797-801.
- Cheng Y., Feng Z., Zhang Q.Z. y Zhang J.T.** Beneficial effects of melatonin in experimental models of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol Sin* (2006) 27: 129-139.
- Chong Z.Z., Li F. y Maiese K.** Activating Akt and the brain's resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury. *Histol Histopathol* (2005) 20: 299-315.
- Cooper P.E., Fernstrom M.H., Rorstad O.P., Leeman S.E. y Martin J.B.** The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. *Brain Res* (1981) 218: 219-232.
- Cordelier P., Esteve J.P. y Bousquet C.** Characterization of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) 94: 9343-9348.
- Corder E.H., Saunders A.M., Risch N.J., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Rimmler J.B., Locke P.A., Conneally P.M., Schmechel K.E., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L. y Pericak-Vance M.A.** Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer's disease. *Nature Genet* (1994) 7: 180-184.
- Cowburn R.F., Fowler C.J. y O'Neill C.** Neurotransmitters, signal transduction and second-messengers in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* (1996) 165: 25-32.
- Cowburn R.F., Fowler C.J., Garlind A., Alafuzoff I., Nilsson L., Winbland B. y Bergström L.** Somatostatin receptors and the modulation of adenylate cyclase activity in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (1991) 54: 748-749.
- Cowburn R.F., Wiehager B., Trief E., Li-Li M. y Sundstrom E.** Effects of beta-amyloid-(25-35) peptides on radioligand binding to excitatory amino acid receptors and voltage-dependent calcium channels: evidence for a selective affinity for the glutamate and glycine recognition sites of the NMDA receptor. *Neurochem Res* (1997) 22: 1437-1442.



- Csaba Z. y Dournaud P.** Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides* (2001) 35: 1-23.
- Csaba Z., Simon A., Helboe L., Epelbaum J. y Dournaud P.** Neurochemical characterization of receptor-expressing cell populations by in vivo agonist-induced internalization: insights from the somatostatin sst2A receptor. *J Comp Neurol* (2002) 454: 192-199.
- Czernik A.J. y Petrack V.** Somatostatin receptor binding in rat cerebral cortex. Characterization using a nonreducible somatostatin analog. *J Biol Chem* (1983) 285: 5525-5530.
- D'Aniello A., Fisher G., Migliaccio N., Cammisia G., D'Aniello E. y Spinelli P.** Amino acids and transaminases activity in ventricular CSF and in brain of normal and Alzheimer patients. *Neurosci Lett* (2005) 388: 49-53.
- Davies P, Katzman R. y Terry R.D.** Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer's disease and Alzheimer senile dementia. *Nature* (1980) 288: 279-280.
- Dawbarn D., Rossor M.N., Mountjov C.Q., Roth M. y Emson P.C.** Decreased somatostatin-immunoreactive but not neuropeptide Y immunoreactive in cerebral cortex in senile dementia of Alzheimer type. *Neurosci Lett* (1986) 70: 154-159.
- Delumeau J.C., Marin P., Tence M., Cordier J., Glowinski J. y Premont J.** Synergistic regulation of cytosolic Ca²⁺ concentration by SRIF and alpha 1-adrenergic agonists in mouse astrocytes. *J Physiol Paris* (1992) 86: 31-38.
- Dennis W. y Dickson M.D.** The pathogenesis of senile plaques. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* (1997) 56: 321-339.
- Dhariwal A.P.S., Krulich L., Katz S. y McCann S.M.** Purification of growth hormone releasing hormone. *Endocrinology* (1965) 77: 932.
- Dickson D.W., Lee S.C., Mattiaggi L.A., Yen S.H. y Brosnan C.** Microglia and cytokines in neurological disease with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* (1993) 7: 75-83.
- Djordjijevic D., Zhang J., Priam M., Viollet C., Gourdji D., Kordon C. y Epelbaum J.** Effect of 17β-estradiol on somatostatin receptor expression and inhibitory effect on growth hormone and prolactin release in rat pituitary cell cultures. *Endocrinol* (1998) 139: 2272-2277.
- Domagk G.** Ein Beitrag Zur. Chemoterapie der bakteriellen infektionen. *Dtsch Med Wochenschr* (1935) 61: 250-256.
- Dornan W.A., Kang D.E., McCampbell A. y Kang E.E.** Bilateral injections of beta A(25-35)+IBO into the hippocampus disrupts acquisition of spatial learning in the rat. *Neuroreport* (1993) 5: 165-168.
- Dournaud P., Cervera-Pierrot P., Hirsch E., Javoy-Agid F., Kordon C., Agid Y. y Epelbaum J.** Somatostatin mRNA-containing neurons in Alzheimer's disease: an in situ hybridation study in hippocampus, parahippocampal cortex and frontal cortex. *Neurosci* (1994) 61:755-764.
- Dournaud P., Jazat-Pondessous F., Slama A., Lamour Y. y Epelbaum J.** Correlations between water maze performance and cortical somatostatin mRNA and high-affinity binding sites during ageing in rats. *Eur J Pharmacol* (1996) 8: 476-485.
- Du Y., Ma Z., Lin S., Dodel R.C., Gao F., Bales K.R., Triarhou L.C., Chernet E., Perry K.W., Nelson D.L., Luecke S., Phebus L.A. y Bymaster F.P.** Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98: 14669-14674.
- Dutar P., Vaillerd C., Viollet C., Billard J.M., Potier B., Carlo A.S., Ungerer A. y Epelbaum J.** Spatial learning and synaptic hippocampal plasticity in type 2 somatostatin receptor knock-out mice. *Neurosci* (2002) 112: 455-466.
- Epelbaum J.** Somatostatin receptors in the central nervous system. En: Weil C., Müller E.E., Thorner M.O., Eds. *Basic and Clinical Aspects of Neuroscience*. Berlin. Springer-Verlag (1992) 14: 17-28.
- Epelbaum J., Tapia-Arancibia L., Cordon C. y Enjalbert A.** Characterization, regional distribution and subcellular distribution of ¹²⁵I-Tyr¹¹-somatostatin binding sites in rat brain. *J Neurochem* (1982) 38: 1515-1523.
- Eppler C.M., Zysk J.R., Corbett M. y Shieh H.M.** The utility of biotinylated somatostatin analogs. *J Biol Chem* (1992) 276: 15603-15612.
- Erdtmann-Vourliotis M., Mayer P., Ammon S., Riechert U. y Höllt V.** Distribution of G-protein-coupled receptor kinase (GRK) isoforms 2, 3, 5 and 6 mRNA in the rat brain. *Molecular Brain Research* (2001) 95: 129-137.



- Familian A., Boshuizen R.S., Eikelenboom P. y Veerhuis R.** Inhibitory effect of minocycline on amyloid beta fibril formation and human microglial activation. *Glia* (2006) 53: 233-240.
- Ferjoux G., Lopez F., Esteve J.P., Ferrend A., Vivier E., Vely F., Saint-Laurent N., Pradrayrol L., Buscail L. y Susini C.** Critical role of src and SHP-2 in sst2 somatostatin receptor-mediated activation of SHP-1 and inhibition of cell proliferation. *Mol Biol Cell* (2003) 14: 3911-3928.
- Florio T., Yao H., Carey K.D., Dillon T.J. y Stork P.J.S.** Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1). *Mol Endocrinol* (1999) 13: 24-37.
- Fodero L.R., Mok S.S., Losic D., Martin L.L., Aguilar M.I., Barrow C.J., Livett B.G. y Small D.H.** $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptors mediate an $A\beta_{1-42}$ induced increase in the level of acetylcholinesterase in primary cortical neurones. *J Neurochem* (2004) 88: 1186-1193.
- Forloni G., Colombo L., Girola L., Tagliavini F. y Salmona M.** Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro. *FEBS Lett* (2001) 487: 404-407.
- Fowler C.J., Cowburn R.F., Garling A. y Winbland B.** Disturbances in signal transduction mechanisms in Alzheimer's disease. *Mol Cell Biochem* (1995) 150: 287-292.
- Fukumoto H., Cheung B.S., Hyman B.T. y Irizarry M.C.** β -secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* (2002) 59: 1381-1389.
- Fukuta T., Nitta A., Itoh A., Furukawa S. y Nabeshima T.** Difference in toxicity of β -amyloid peptide with aging in relation to nerve growth factor content in the rat brain. *J Neural Transm* (2001) 108: 221-230.
- Gainetdinov R.R., Premont R.T., Bohn L.M., Lefkowitz R.J. y Caron M.G.** Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* (2004) 27: 107-144.
- Gandy S.** The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* (2005) 115: 1121-1129.
- Garling A., Fowler C.J., Alafuzoff I., Winbland B. y Cowburn R.F.** Neurotransmitter-mediated inhibition of post-mortem human brain adenylyl cyclase. *J Neural Transm Gen Sect* (1992) 87: 113-124.
- Garret B., Finsen B. y Wree A.** Parcellation of cortical areas by in situ hybridization for somatostatin mRNA in the adult rat: frontal, parietal, occipital and temporal regions. *Anat Embryol (Berl)* (1994) 190: 389-398.
- Gervais F., Paquette J., Morissette C., Krzykowski P., Yu M., Azzi M., Lacombe D., Kong X., Aman A., Laurin J., Szarek W.A. y Tremblay P.** Targeting soluble Abeta peptide with tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiol Aging* (2006) (en prensa).
- Gilman A.G.** A protein binding assay for adenosine 3' 5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* (1970) 67: 305-312.
- Giovannelli L., Casamenti F., Scali C., Bartonili L. y Pepeu G.** Differential effects of amyloid peptides β (1-40) and β (25-35) injections into the rat nucleus basalis. *Neuroscience* (1995) 66: 781-792.
- Giulian D. y Corpuz M.** Microglial secretion products and their impact on the nervous system. *Adv Neurol* (1993) 59: 315-320.
- Glenner G.G. y Wong C.W.** Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* (1984) 120: 885-890.
- Glos M., Kreienkamp H.J., Haussmann H. y Richter D.** Characterization of the 5'-flanking promoter region of the rat somatostatin receptor subtype 3 gene. *FEBS Lett* (1998) 440: 33-37.
- Glowinski J. y Iversen L.L.** Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3 H]norepinephrine, [3 H]dopamine and [3 H]DOPA in various regions of the brain. *J Neurochem* (1966) 13: 655-669.
- Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Guiffra L., Haynes A., Irving N., James L., Mant R., Newton P., Rooke K., Roques P., Talbot C., Pericak-Vance M., Roses A., Williamson R., Rossor M., Owen M. y Hardy J.** Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* (1991) 349:704-706.
- Gomez-Isla T., Hollister R., West H., Mui S., Growdon J.H., Petersen R.C., Parisi J.E. y Hyman B.T.** Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* (1997) 41: 17-24.



- González-Albo M., Elston G.N. y DeFelipe J.** The human temporal cortex: characterization of neurons expressing nitric oxide synthase, neuropeptides and calcium-binding proteins and their glutamate receptors subunit profiles. *Cerebr cortex* (2001) 11: 1170-1181.
- Gottfries C.G.** Neurochemical aspects on aging and diseases with cognitive impairment. *J Neurosci Res* (1990) 27: 541-547.
- Goux W.J.** The conformations of filamentous and soluble tau associated with Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* (2002) 41: 13798-13806.
- Gowing E., Roher A.E., Woods A.S., Cotter R.J., Chaney M., Little S.P. y Ball M.J.** Chemical characterization of A β 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* (1994) 269: 10987-10990.
- Greenwood F.C., Hunter W.M. y Glover J.S.** The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *J Neurochem* (1963) 89: 114-123.
- Gromada J., Hoy M., Buschard K., Salile A. y Rorsmann P.** Somatostatin inhibits exocytosis in rat pancreatic α -cells by Gi2-dependent activation of calcineurin and depriming of secretory granules. *J Physiol* (2001) 535: 519-532.
- Guan Z.Z., Yu W.F., Shan K.R. y Nordberg A.** Loss of nicotinic receptors induces by beta-amyloid peptides in PC12 cells: possible mechanism involving lipid peroxidation. *J Neurosci Res* (2003) 71: 397-406.
- Haass C., Hung A.Y. y Selkoe D.J.** Processing of β -amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors a localization in internal vesicles over constitutive secretion. *J Neurosci* (1991) 11: 3783-3793.
- Hackmann C.H.** Beobachtungen über die beeinflussbarkeit von alterserscheinungen bei versuchstieren. *Münich Mediz Wrschr* (1958) 100: 1814-1817.
- Hama E. y Saido TC.** Etiology of sporadic Alzheimer's disease: Somatostatin, neprilysin, and amyloid β peptide. *Med Hypotheses* (2005) 65: 498-500.
- Hanisch U.K., Seto D. y Quirion R.** Modulation of hippocampal acetylcholine release: a potent central action of interleukin-2. *J Neurosci* (1993) 13: 3368-3374.
- Hardy J.** The Alzheimer family of diseases: many etiologies one pathogenesis? *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) 94: 2095-2097.
- Hardy J. y Selkoe D.J.** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* (2002) 297: 353-356.
- Hardy J., Adolfsson R. y Alafuzoff I.** Transmitter deficits in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* (1985) 7: 545-563.
- Hathway G.F., Humphrey P.P. y Kendrick K.M.** Evidence that somatostatin sst2 receptors mediate striatal dopamine release. *Br J Pharmacol* (1999) 128: 1346-1352.
- Hawes J.J., Brunzell D.H., Wynick D., Zachariou V. y Picciotto M.R.** GalR1, but not GalR2 or GalR3, levels are regulated by galanin signaling in the locus coeruleus through a cyclic AMP-dependent mechanism. *J Neurochem* (2005) 93: 1168-1176.
- Heneka M.T., Galea E., Gavrilyuk V., Dumitrescu-Ozimek L., Daeschner J., O'Banion M.K., Weinberg G., Klockgether T. y Feinstein D.L.** Noradrenergic depletion potentiates β -amyloid-induced cortical inflammation: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* (2002) 22: 2434-2442.
- Hierowski M.T., Liebow C., Du Sapin K. y Schally A.V.** Stimulation by somatostatin of dephosphorylation of membrane proteins in pancreatic cancer MIA PaCa-2 cell line. *FEBS Lett* (1985) 179: 252-256.
- Hou C., Robin L.G. y Barber D.L.** Subtype-specific signaling mechanisms of somatostatin receptors SSTR1 and SSTR2. *J Biol Chem* (1994) 269: 10357-10362.
- Houslay M.D., Metcalfe J.C., Warren G.B., Hesketh T.R. y Smith G.A.** The glucagon receptor of rat liver plasma membrane can couple to adenylate cyclase without activating it. *Biochem Biophys Acta* (1976) 436: 489-494.
- Huang H.M., Ou H-C. y Hsueh S.J.** Amyloid β peptide enhanced bradykinin-mediated inositol (1,4,5) triphosphate formation and cytosolic free calcium. *Life Sci* (1998) 69: 195-203.



- Hukovic N., Rocheville M., Kumar U., Sasi R., Khare S. y Patel Y.C.** Agonist-dependent up-regulation of human somatostatin receptor type 1 requires molecular signals in the cytoplasmic-C-tail. **J Biol Chem** (1999) 274: 24550-24558.
- Hunter C.L., Bimonte-Nelson H.A., Nelson M., Eckman C.B. y Granholm A.C.** Behavioral and neurobiological markers of Alzheimer's disease in Ts65Dn mice: effects of estrogen. **Neurobiol Aging** (2004, a) 25: 873-884.
- Hunter C.L., Quintero E.M., Gilstrap L., Bhat N.R. y Granholm A.C.** Minocycline protects basal forebrain cholinergic neurons from mu p75-saporin immunotoxic lesioning. **Eur J Neurosci** (2004, b) 19: 3305-3316.
- Itoh A., Nitta A., Nadai M., Nishimura K., Hirose M., Hasegawa T. y Nabeshima T.** Dysfunction of cholinergic and dopaminergic neuronal systems in β -amyloid protein-infused rats. **J Neurochem** (1996) 66: 1113-1117.
- Iwata N., Mizukami H., Shirotani K., Takaki Y., Muramatsu S., Lu B., Gerard N.P., Gerard C., Okawa K. y Saido T.C.** Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid β peptide in mouse brain. **J Neurosci** (2004) 24: 991-998.
- Iwata N., Tsubuki S., Takaki Y., Shirotani K., Lu B., Gerard N.P., Gerard C., Hama E., Lee H.J. y Saido T.C.** Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. **Science** (2001) 292: 1550-1552.
- Iwata N., Tsubuki S., Takaki Y., Watanabe K., Sekiguchi M., Hosoki E., Kawashima-Morishima M., Lee H.J., Hama E., Sekine-Aizawa Y. y Saido T.C.** Identification of the major A β (1-42) degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. **Nat Med** (2000) 6: 143-150.
- Jacquin T., Champagnat J., Madamba S., Denavit-Saubie M. y Siggins G.R.** Somatostatin depresses excitability in neurons of the solitary tract complex through hyperpolarization and augmentation of I_M a non-inactivating voltage-dependent outward current blocked by muscarinic agonists. **Proc Natl Acad Sci USA** (1988) 85: 948-952.
- James R.A., Sarapura V.D., Bruns C., Raulf F., Dowding J.M., Gordon D.F., Wood W.M. y Ridgway E.C.** Thyroid hormone-induced expression of specific somatostatin receptor subtypes correlates with involution of the TtT-97 murine thyrotrope tumor. **Endocrinol** (1997) 137: 719-724.
- Jin Y., Yan E.Z., Fan Y., Zong Z.H., Qi Z.M. y Li Z.** Sodium ferulate prevents amyloid-beta-induced neurotoxicity through suppression of p38 MAPK and upregulation of ERK1/2 and Akt/protein kinase B in rat hippocampus. **Acta Pharmacol Sin** (2005) 26: 943-951.
- Jöels M., Madamba S.G., Moore S.D. y Morrison G.R.** Somatostatin immunohistochemistry of hippocampal slices with lucifer yellow-stained pyramidal neurons responding to somatostatin. **Regul Pept** (1990) 28: 215-221.
- Johannsen P.** Long-term cholinesterase inhibitor treatment of Alzheimer's disease. **CNS Drugs** (2004) 18: 757-768.
- Johansson O., Hokfelt T. y Elde R.P.** Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. **Neurosci** (1984) 13: 265-339.
- Kaneko I., Morimoto K. y Kubo T.** Drastic neuronal loss in vivo by β -amyloid racemized at Ser²⁶ residue: conversion of nontoxic [D-Ser²⁶] β -amyloid 1-40 to toxic and protease-resistant fragments. **Neurosci** (2001) 104: 1003-1011.
- Kanemitsu H., Tomiyama T. y Mori H.** Human neprilysin is capable of degrading amyloid β peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. **Neurosci Lett** (2003) 350: 113-116.
- Kanfer J.N., Sorrentino G. y Sitar D.S.** Phospholipases as mediators of amyloid beta peptide neurotoxicity: an early event contributing to neurodegeneration characteristic of Alzheimer's disease. **Neurosci Lett** (1998) 257:93-6.
- Karanth S., Agula M.C. y Mc Cann S.M.** The influence of interleukin-2 on the release of somatostatin and growth hormone-releasing hormone by mediobasal hypothalamus. **Neuroendocrinol** (1993) 58: 185-190.



- Karbownick M., Brzezińska E., y Lewinski A.** Increased expression of mRNA specific for thymidine kinase deoxytyridine kinase of thymidine phosphorylase in human papillary thyroid carcinoma. *Cancer Lett* (2005) 225: 267-273.
- Kato K., Kurobe N., Suzuki F., Marishita R., Asano T. y Imagaki T.** Concentrations of several proteins characteristic of nervous tissue in cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* (1991) 3: 95-99.
- Kemali D., Gaitonde M.K. y Coppén A.J.** The transfer of 35s-methionine sulphone across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (1963) 26: 220-222.
- Kesner R.P. y Hopkins R.O.** Mnemonic functions of the hippocampus: a comparison between animals and humans. *Biol Psychol* (2006) 73: 3-18.
- Khare S., Kumar U., Sasi R., Puebla L., Calderon L., Lemstrom K., Hayry P. y Patel Y.C.** Differential regulation of somatostatin receptor types 1-5 in rat aorta after angioplasty. *FASEB* (1999) 13: 387-394.
- Kimura N., Tomizawa S., Arai K.N. y Kimura N.** Chronic treatment with estrogen up-regulates expression of sst2 messenger ribonucleic acid (mRNA) but down-regulates expression of sst5 mRNA in rat pituitaries. *Endocrinol* (1998) 139: 1573-1580.
- Kimura N., Tomizawa S., Arai K.N., Osamura R.Y. y Kimura N.** Characterization of 5'-flanking region of rat somatostatin receptor sst2 gene: transcriptional regulatory elements and activation by Pitx1 and estrogen. *Endocrinol* (2001) 142: 1427-1441.
- Kittur S.D., Kittur D.S., Soncrant T.T., Rapoport S.I., Tourtellotte W.W., Nagel J.E. y Adler W.H.** Soluble interleukin-2 receptors in cerebrospinal fluid from individuals with various neurological disorders. *Ann Neurol* (1990) 28: 168-173.
- Klegeris A. y Mc Geer P.L.** Beta-amyloid protein enhances macrophage production of oxygen free radicals and glutamate. *J Neurosci Res* (1997) 49: 229-235.
- Kleuss C., Hescheler J., Ewel C., Rosenthal W., Schultz G. y Wittig B.** Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature* (1991) 353: 43-49.
- Kluxen F., Bruns C. y Lübbert H.** Expression cloning of a rat brain somatostatin receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89: 4618-4622.
- Koch H.J., Uyanik G. y Fischer-Barnicol D.** Memantine: a therapeutic approach in treating Alzheimer's and vascular dementia. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* (2005) 4: 499-506.
- Kohout T.A. y Lefkowitz R.J.** Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* (2003) 63: 9-18.
- Kong H., DePaoli A.M., Breder C.D., Yasuda K., Bell G.I. y Reisine T.** Differential expression of messenger RNAs for somatostatin receptor subtypes SSTR1, SSTR2 and SSTR3 in adult rat brain: analysis by RNA blotting and situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* (1994) 59: 175-184.
- Kowk R.P., Lundblad J.R., Chrivia J.C., Richards J.P., Bachinger H.P., Brennan R.G., Roberts S.G.E., Green M.R. y Goodman R.H.** Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* (1994) 370: 223-226.
- Kozasa T., Kaziro Y., Ohtsuka T., Grig J.J., Nakajima S. y Nakajami Y.** G protein specificity of the muscarine-induced increase in an inward rectifier potassium current in AtT-20. *Neurosci Res* (1996) 26: 289-297.
- Kramer D., Caruso A., Nicoletti F. y Genazzani A.A.** Somatostatin and somatostatin receptor 2 are reciprocally controlled by calcineurin during cerebellar granule cell maturation. *J Neurochem* (2005) 94: 1374-1383.
- Krantic S., Robitaille J. y Quirion R.** Deficit in the somatostatin SS₁ receptor subtype in frontal and temporal cortices in Alzheimer's disease. *Brain Res* (1992) 573: 299-304.
- Kraus J., Wöltje M., Schönwetter N. y Hölt V.** Gene structure and regulation of the somatostatin receptor type 2. *J Physiol (Paris)* (2000) 94: 199-204.
- Kreienkamp H.J., Roth A. y Richter D.** Rat somatostatin receptor subtype-4 can be made sensitive to agonist-induced internalization by mutation of a single threonine (residue 331). *DNA Cell Biol* (1998) 17: 869-878.
- Kreienkamp H.J., Roth A. y Richter D.** Coupling of rat somatostatin receptor subtypes to a G-protein gated inwardly rectifying potassium channels (GIRK1). *FEBS Lett* (1997) 417: 92-94.



- Krulich L., Dhariwall A.P.S. y McCann S.M.** Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. **Endocrinol** (1968) 83: 783-790.
- Kubo T., Morimoto K., Kumagae Y., Miller C.A. y Kaneko I.** A posible mechanism of neurodegeneration in Alzheimer's disease-involvement of racemized β -amyloid. **Soc Neurosci Abstr** (1999) 25: 838.
- Kubo T., Nishimura S., Kumagae Y. y Kaneko I.** In vivo conversion of racemized β -amyloid ([D-Ser²⁶]A β 1-40) to truncated and toxic fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. **J Neurosci Res** (2002) 70: 474-483.
- Kubota A., Yamada Y., Kagimoto S., Yasuda K., Someya Y., Ihara Y., Okamoto Y., Kozasa T., Seino S. y Seino Y.** Multiple effector coupling of somatostatin receptor subtype SSTR1. **Biochem Biophys Res Commun** (1994) 204: 176-186.
- Lachowicz A., Stepien H., Kunert-Radek J. y Pawlikowski M.** Effects of somatostatin on inositol-1,4,5-triphosphate content in mouse spleen lymphocytes. **Comp Bioch Physiol** (1992) 101: 661-664.
- Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** (1970) 227: 680-685.
- Lamberts S.W.J., Van der Lely A.J. y de Herder W.W.** Drug therapy: Octreotide. **N Engl J Med** (1996) 334: 246-254.
- Lapchak P.A. y Aurojo D.M.** Interleukin-2 regulates monoamine and opioid peptide release from the hypothalamus. **Neuroreport** (1993) 4: 303-306.
- Law S.F. y Reisine T.** Agonist binding to rat brain somatostatin receptors alters the interaction of the receptors with guanine nucleotide-binding regulatory proteins. **Mol Pharmacol** (1992) 42: 398-402.
- Law S.F., Manning D. y Reisine T.** Identification of the subunits of GTP-binding proteins coupled to somatostatin receptors. **J Biol Chem** (1991) 266: 17885-17897.
- Lee S.M., Yune T.Y., Kim S.J., Kim Y.C., Oh Y.J., Marketonis G.J. y Oh T.H.** Minocycline inhibits apoptotic cells death via attenuation of TNF-alpha expression following iNOS/NO induction by lypopolysaccharide in neuron/glia co-cultures. **J Neurochem** (2004) 91: 568-578.
- Leissring M.A., Farris W., Chang A.Y., Waslsh D.M., Wu X., Sun X., Frosch M.P. y Selkoe D.J.** Enhanced proteolysis of β amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation secondary pathology and premature death. **Neuron** (2003) 40: 1087-1093.
- Lemere C.A., Blustzjan J.K., Yamaguchi H., Wisniewski T., Saido T.C. y Selkoe D.J.** Sequence of deposition of heterogeneous amyloid β -peptides and Apo E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. **Neurobiol Dis** (1996) 3: 16-32.
- Leranth C. y Frotscher M.** Cholinergic innervation of hippocampal GAD- and somatostatin-immunoreactive commissural neurons. **J Comp Neurol** (1987) 261: 33-47.
- Liu B y Hong JS.** Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: study of mechanism and strategies for therapeutic intervention. **J Pharmacol Exp Ther** (2003) 304: 1-7.
- Lonze B.E. y Ginty D.D.** Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous systems. **Neurons** (2002) 35: 605-623.
- Lopez F., Esteve J.P., Buscail L., Delesque N., Saint-Laurent N., Theveniau M., Nahmias C., Vaysse N. y Susini C.** The tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the SST2 somatostatin receptor and is an essential component of SST2-mediated inhibitory growth signalling. **J Biol Chem** (1997) 272: 24448-24454.
- Lorenzo A. y Yankner B.A.** β -amyloid neurotoxicity requires fibril formation and its inhibited by Congo red. **Proc Natl Acad Sci USA** (1994) 91: 12243-12247.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** (1951) : 265-275.
- Luini A. y de Matteis M.A.** Evidence that receptor-linked G protein inhibits exocytosis by a post-second messenger mechanism in AtT-20. **J Neurochem** (1990) 54: 30-38.
- MacDonald H., Kelly R.G., Allens E.S., Noble J.F. y Kanegis L.A.** Pharmacokinetic studies on minocycline in man. **Clin Pharmacol Ther** (1973) 14: 852-861.



- Malm D., Gjaever A., Vonen B., Burhol P.G. y Florholmen J. Somatostatin inhibition of phospholipase C activity in isolated rat pancreatic islets. *Acta Physiol Scand* (1991) 413-419.
- Mann D.M.A., Iwatsubo T., Cairns N.J., Lantos P.L., Nochlin D., Sumi S.M., Bird T.D., Poorkaj P., Hardy J., Hutton M., PriharG., Crook R., Rossor M.N. y Haltia M. Amyloid beta protein (A-beta) deposition in chromosome 14-linked Alzheimer's disease: predominance of A-beta [42(43)]. *Ann Neurol* (1996) 40: 149-156.
- Mark R.J., Pang Z., Geddes J.W., Vehida K. y Mattson M.P. Amyloid β -peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *J Neurosci* (1997) 17: 1046-1054.
- Mash D.C., Flynn D.D. y Potter L.T. Loss of M2 muscarine receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation. *Science* (1985) 228: 1115-1117.
- Masilamoni J.G., Jesudason E.P., Jesudoss K.S., Murali J., Paul S.F. y Jayakumar R. Role of fibrillar Abeta25-35 in the inflammation induced rat model with respect to oxidative vulnerability. *Free Radic Res* (2005) 39: 603-612.
- Masters C.L. y Beyreuther K. The neuropathology of Alzheimer's disease, en *Neurodegenerative Diseases: Neurobiology, pathogenesis and therapeutics* (2005) (Beal M.F. Lang A.E. y Lupdolph A.) pag 433-440, editorial: Cambridge University Press. Cambridge U.K.
- Matsuoka N., Kaneko S. y Satoh M.A. Facilitatory role of endogenous somatostatin in long-term potentiation of the mossy fiber CA3-system in guinea pig hippocampus. *Neurosci Lett* (1991) 129: 177-180.
- Mattson M.P. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* (1997) 77: 1081-1132.
- Maurice T., Lockhart B.P. y Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered β -amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res* (1996) 706: 181-193.
- Mc Geer E.G. y Mc Geer P.L. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (2003) 27: 741-749.
- Meda L. Cassatella M.A., Szendrei G.I., Otvos L.Jr., Baron D., Villalba M., Ferrari D. y Rossi F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* (1995) 374: 647-650.
- Métayé T., Gibelin H., Perdrisot R. y Kraimps J.L. Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* (2005) 17: 917-928.
- Montminy M.R. y Bilezikjian L.M. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* (1987) 328: 175-178.
- Montminy M.R., Brindle P., Arias J., Ferreri K. y Armstrong R. Regulation of somatostatin gene transcription by cyclic adenosine monophosphate. *Metabolism* (1996) 45: 4-7.
- Montminy M.R., Goodman R.H., Horovitch S.J. y Habener J.F. Primary structure of the gene encoding rat preprosomatostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* (1984) 81: 3337-3340.
- Moore S.D., Madamba S.G., Joels M. y Siggins G.R. Somatostatin augments the M-current in hippocampal neurons. *Science* (1988) 239: 278-280.
- Mork A. y Geisler A. Effects of minocycline on accumulation of cyclic AMP in cerebral cortex of rat. A comparison with lithium. *Neuropharmacol* (1993) 32: 793-798.
- Muñoz-Acedo G., Izquierdo-Claros R.M., Sánchez-Alonso J.A., del Hoyo N., Pérez-Albarsanz M.A. y Arilla E. Effect of somatostatin on the mass accumulation of inositol-1,4,5-trisphosphate in rat hypothalamus, striatum, frontoparietal cortex and hippocampus. *Neurosci Lett* (1995) 197: 41-44.
- Myhrer T. y Paulsen R.E. Infusion of D-cycloserine into temporal-hippocampal areas and restoration of mnemonic function in rats with disrupted glutamatergic temporal systems. *Eur J Pharmacol* (1997) 328: 1-7.
- Nag S. y Tang F. Cholinergic lesions of the rat brain by ibotenic acid and 192IgG-saporin: Effect on somatostatin, substance P and neuropeptide Y levels in the cerebral cortex and the hippocampus. *Neurosci Lett* (1998) 252: 83-86.
- Nag S., Yee B.K. y Tang F. Reduction in somatostatin and substance P levels and choline acetyltransferase activity in the cortex and choline hippocampus of the rat after chronic intracerebroventricular infusion of β -amyloid (1-40). *Brain Res Bull* (1999) 50: 251-262.



- Nikodemova M., Duncan I.D. y Watters J.J.** Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and I κ B α degradation in a stimulus-specific manner in microglia. **J Neurochem** (2006) 96: 314-323.
- Nitta A., Itoh A., Hasegawa T. y Nabeshima T.** β -amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. **Neurosci Lett** (1994) 170: 63-66.
- Nordberg A.** Neuroreceptor changes in Alzheimer disease. **Cerebrovasc Brain Metab Rev** (1992) 4: 303-328.
- O'Carroll A., Lolait S.J., König M. y Mahan L.C.** Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28. **Mol Pharmacol** (1992) 42: 939-946.
- O'Mahony S., Harkany T., Rensink A.M., Abraham I., De Jong G.I., Varga J.L., Zarandi M., Penke D., Nyakas C., Luiten P.G.M. y Leonard B.E.** Beta-amyloid-induced cholinergic denervation correlates with enhanced nitric oxide synthase activity in rat cerebral cortex: reversal by NMDA receptor blockade. **Brain Res Bull** (1998) 45: 405-411.
- Oakley R.H., Laporte S.A., Holt J.A., Barak L.S. y Caron M.G.** Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor β -arrestin complexes after receptor endocytosis. **J Biol Chem** (2001) 276: 19452-19460.
- Ohm T.G., Bohl J. y Lemmer B.** Reduced basal and stimulated (isopresaline, Gpp(NH)p, forskolin) adenylate cyclase activity in Alzheimer's disease correlated with histopathological changes. **Brain Res** (1991) 540: 229-236.
- Ohno M., Shibata S., Yamamoto T. y Watanabe S.** Working memory deficits following muscarinic blockade combined with depletion of brain somatostatin in rats. **Brain Res** (1993) 610: 348-353.
- Okamoto T., Takeda S., Murayama Y., Ogata E. y Nishimoto I.** Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. **J Biol Chem** (1995) 270: 4205-4208.
- Olariu A., Tran M.H., Yamada K., Mizuno M., Hefco V. y Nabeshima T.** Memory deficits and increased emotionality induced by β -amyloid (25-35) are correlated with reduced acetylcholine release and altered phorbol dibutyrate binding in the hippocampus. **J Neural Transm** (2001) 108: 1065-1079.
- Olariu A., Yamada K., Mamiya T., Hefco V. y Nabeshima T.** Memory impairment induced by chronic intracerebroventricular infusion of beta-amyloid (1-40) involves downregulation of protein kinase C. **Brain Res** (2002) 957: 278-286.
- Oldtersdorf T., Ward P.J., Henriksson T., Beattie E.C., Neve R., Lieberburg I. y Fritz L.C.** The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradation pathway. **J Biol Chem** (1990) 265: 4492-4497.
- Ono K., Hasegawa K., Naiki H., y Yamada M.** Anti-amyloidal activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. **Biochim et Biophys Acta** (2004) 1690: 193-202.
- Pan M.G., Florio T. y Stork P.J.S.** G protein activation of a hormone stimulated phosphatase in human tumor cells. **Science** (1992) 256: 1215-1217.
- Papachristou D.N., Liu J.L. y Patel Y.C.** Glucocorticoids regulate somatostatin peptide and steady state messenger ribonucleic acid levels in normal rat tissues and in a somatostatin-producing islet tumor cells line (1027 B₂). **Endocrinol** (1994) 225: 9-66.
- Park E.M. y Cho S.** Enhanced ERK dependent CREB activation reduces apoptosis in staurosporine-treated human neuroblastoma SK-N-BE(2)C cells. **Neurosci Lett** (2006) 402: 190-194.
- Parks J.K., Smith T.S., Trimmer P.A., Bennet Jr J.P. y Parker Jr W.D.** Neurotoxic A β peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide synthase mechanism, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro. **J Neurochem** (2001) 76: 1050-1056.
- Patel Y.C.** General aspects of the biology and function of somatostatin. En: Weil C., Müller E.E., Thorner M.O., Eds. **Basic and Clinical Aspects of Neuroscience**. Berlin. Springer-Verlag (1992) 4: 1-16.
- Patel Y.C.** Somatostatin and its receptors. **Front Neuroendocrinol** (1999) 20: 157-198.



- Patel Y.C. y Galanopoulou A.** Processing and intracellular targeting of prosomatostatin-derived peptides: the role of mammalian endoproteases. *Ciba Found Symp* (1995) 190: 26-40; discusión 40-50.
- Patel Y.C. y Reichlin S.** Somatostatin in hypothalamus extahypothalamic brain and peripheral tissues of the rat. *Endocrinol.* (1978) 102: 523-530.
- Patel Y.C., Murthy K.K., Escher E., Banville D., Spiess J. y Srikant C.B.** Mechanism of action of somatostatin: an overview of receptor function and studies of the molecular characterization and purification of somatostatin receptor proteins. *Metabolism* (1990) 39: 63-69.
- Paxinos G. y Watson C.** *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic, California (1956).
- Penela P., Murga C., Ribas C., Tutor A.S., Peregrín S. y Mayor Jr.F.** Mechanisms of regulation G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* (2006) 69: 46-56.
- Pérez J., Rigo M., Kaupmann K., Bruns C., Yasuda K., Bell G.I., Lubbert H. y Hoyer D.** Localization of somatostatin (SRIF) SSTR1, SSTR2 and SSTR3 receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Naunym Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (1994) 349: 145-160.
- Pi R., Li W., Lee N.T.K., Chan H.H.N., Pu Y., Chan L.N., Sucher N.J., Chang D.C. y Han Y.** Minocycline prevents glutamate-induced apoptosis of cerebellar granule neurons by differential regulation of p38 and Akt pathways. *J Neurochem* (2004) 91: 1219-1230.
- Pierotti C.J., Harmar A., Simpson J. y Yates C.** High molecular weight forms of somatostatin are reduced in Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neurosci Lett* (1985) 63: 141-146.
- Pike C.J., Brudick D., Walencewicz A.J., Glab C.G. y Cotman C.W.** Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* (1993) 13: 1676-1687.
- Pike C.J., Walencewicz A.J., Glabe C.G. y Cotman C.W.** In vitro aging of β -amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res* (1991) 563: 311-331.
- Pitcher J.A., Hall R.A., Daaka Y., Zhang J., Ferguson S.S., Hester S., Miller S., Caron M.G., Lefkowitz R.J. y Barak L.S.** The G-protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule associated protein kinase that phosphorylates tubulin. *J Biol Chem* (1998) 273: 12316-12324.
- Pradayrol L., Jornvall J., Mutt V. y Ribet A.** N-terminal extended somatostatin: The primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett* (1980) 109: 55-58.
- Prasad M.R., Lovell M.A., Yatin M., Dhillon H. y Markesbery W.R.** Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* (1998) 23: 81-88.
- Premont R.T., Matsuoka I., Mattei M.G., Pouille Y., Defer N. y Hanoune J.** Identification and characterization of a widely expressed form of adenylyl cyclase. *J Biol Chem* (1996) 271: 13900-13907.
- Pronin A.N., Morris A.J., Surguchov A. y Benovic J.L.** Synucleins are a novel class of substrates for G-protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* (2000) 275: 26515-26522.
- Puebla L. y Arilla E.** Exogenous histamine increases the somatostatin receptor/effector system in the rat frontoparietal cortex. *Eur J Pharmacol* (1995) 289: 361-368.
- Puebla L. y Arilla-Ferreiro E.** Modulation of somatostatin receptors, somatostatin content and Gi proteins by substance P in the rat frontoparietal cortex and hippocampus. *J Neurochem* (2003) 84: 145-156.
- Ramirez J.L., Mouchantal R., Kumar U., Otero Corchon V., Rubinstein M., Low M.J. y Patel Y.C.** Brain somatostatin receptors are up-regulated in somatostatin-deficient mice. *Mol Endocrinol* (2002) 16: 1951-1963.
- Ramos-Ruiz R., Penela P., Penn R.B. y Mayor Jr.F.** Analysis of human G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. *Circulation* (2000) 101: 2083-2089.
- Ravina A.** Une thérapeutique nouvelle de la vieillesse et des états de sénescence. *Presse Med* (1965) 73: 1737-1741.
- Ravina A. y Hackmann C.H.** Some considerations on the patogenesis and treatment of aging. *Presse Med* (1967) 75: 885-886.



- Reardon D.B., Dent P., Wood S.L., Kong T. y Sturgill T.W.** 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* (1997) 11: 1062-1069.
- Reisine T. y Bell G.I.** Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocr Rev* (1995) 16: 427-442.
- Rens-Domiano S., Law S.F., Yamada Y., Seino S., Bell G.I. y Reisine T.** Pharmacological properties of two cloned somatostatin receptors. *Mol Pharmacol* (1992) 42: 28-34.
- Reubi J.C.** Evidence for two somatostatin receptor types in rat brain cortex. *Neurosci Lett* (1984) 49: 259-263.
- Reubi J.C. y Maurer R.** Autoradiographic mapping of somatostatin receptors in the rat central nervous system and pituitary. *Neurosci* (1985) 15: 1183-1193.
- Reubi J.C., Perrin M.H., Rivier J.E., y Vale W.** High affinity binding sites for a somatostatin-28 analog in rat brain. *Life Sci* (1981) 28: 2191-2198.
- Rhee S.G. y Choi K.D.** Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isoenzymes. *J Biol Chem* (1992) 267: 12393-12396.
- Rohrer L., Raulf F., Bruns C., Buettner R., Hofstaedter F. y Schüle R.** Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90: 4196-4200.
- Ross E.** Signal sorting and amplification through G protein-coupled receptors. *Neuron* (1989) 3: 141-152.
- Rossor M.N., Fox N.C., Freeborough P.A. y Harvey R.J.** Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurodegeneration* (1996) 5: 393-397.
- Rymer D.L. y Good T.A.** The role G protein activation in the toxicity of amyloidogenic A β (1-40), A β (25-35), and bovine calcitonin. *J Biol Chem* (2001) 276: 2523-2530.
- Ryu J.K., Franciosi S., Sattayaprasert P., Kim S.U. y McLarnon J.G.** Minocycline inhibits neuronal death and glial activation induced by β -amyloid peptide in rat hippocampus. *Glia* (2004) 48: 85-90.
- Saido T.C. y Iwata N.** Metabolism of amyloid β peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease. Towards presymptomatic diagnosis, prevention and therapy. *Neurosci Res* (2006) 54: 235-253.
- Saito T., Iwata N., Tsubuki S., Takaki Y., Takano J., Huang S.H., Suemoto T., Higuchi M. y Saido T.C.** Somatostatin regulates brain amyloid β peptide A β ₄₂ through modulation of proteolytic degradation. *Nature Medicine* (2005) 11: 434-439.
- Schettini G., Florio T., Meucci O., Landolfi E., Grimaldi M., Ventra C. y Marino A.** Somatostatin inhibition of adenylate cyclase activity in different brain areas. *Brain Res* (1989) 492: 65-71.
- Scheuner D., Eckman C., Jensen M., Song X., Citron M., Suzuki N., Bird T.D., Hardy J., Hutton M., Kukull W., Larson E., Levy-Lahad E., Viitanen M., Peskind E., Poorkaj P., Schellenberg G., Tanzi R., Wasco W., Lannfelt L., Selkoe D.J. y Yonkin S.** Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* (1996) 2: 864-870.
- Schindler M., Humphrey P.P.A. y Emson P.C.** Somatostatin receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol* (1996) 50: 9-47.
- Schmechel D.E., Goldgaber D., Burkhart D.S., Gilbert J.R., Gajdusek D.C. y Roses A.D.** Cellular localization of messenger RNA encoding amyloid-beta-protein in normal tissue and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* (1988) 2: 96-111.
- Schonbrunn A.H. y Tashjian A.J.R.** Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture. *J Biol Chem* (1978) 253: 6473-6483.
- Schubert W., Prior R., Weidemann A., Dirksen H., Multhaup G., Masters C.L. y Beyreuther K.** Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res* (1991) 563:184-194.
- Schwartz J.P., Ji Z. y Epelbaum J.** Somatostatin as a neurotrophic factor. Which receptor/second messenger transduction system is involved?. *Perspect Dev Neurobiol* (1998) 5: 427-435.
- Schwartz P.T y Vallejo M.** Differential regulation of basal and cyclic adenosine 3', 5' monophosphate-induced somatostatin gene transcription in neural cells by DNA control elements that bind homeodomain proteins. *Mol Endocrinol* (1998) 12: 1280-1293.



- Schweitzer P., Madamba S. y Siggins G.R.** Arachidonic acid metabolites as mediators of somatostatin-induced increase of neuronal M-current. *Nature* (1990) 346: 464-467.
- Seabrook T.J., Jiang L., Maier M. y Lewere C.A.** Minocycline affects microglial activation, A β deposition and behavior in APP-tg mice. *Glia* (2006) 53: 776-782.
- Segond von Banchet G., Schindler M., Hervieu G.J., Beckmann B., Emson P.C. y Heppelmann B.** Distribution of somatostatin receptor subtypes in rat lumbar spinal cord examined with gold-labelled somatostatin and anti-receptor antibodies. *Brain Res* (1999) 816: 254-257.
- Selkoe D.J.** Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol Rev* (2001) 81: 741-766.
- Selkoe D.J.** Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes and treatments. *Science* (1997) 275:630-631.
- Selkoe D.J., Podlisny M.B., Joachim C.L., Vickers E.A., Lee G., Fritz L.C. y Oltersdorf T.** β -Amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110-135 kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* (1988) 85: 7341-7345.
- Seubert P., Oltersdorf T., Lee M.G., Barbour R., Blomquist C., Davies D.L., Bryant K., Fritz L.C., Galasko D., Thal L.J., Lieberburg I. y Schenk D.B.** Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the β -amyloid peptide. *Nature* (1993) 361: 260-263.
- Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Esch F., Lee M., Dovey H., Davis D., Sinha S., Schlossmacher M., Whaley J., Swindlehurst C., McCormack R., Wolfert R., Selkoe D., Lieberburg I., y Schenk D.** Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature* (1992) 359: 325-327.
- Sharma K., Patel Y.C. y Srikant C.B.** C-terminal region of human somatostatin receptor 5 is required for induction of Rb and G1 cell cycle arrest. *Mol Endocrinol* (1999) 13: 82-90.
- Shaw D., Best J., Dinnell K., Nadin A., Shearman M., Pattison C., Peachey J., Reilly M., Williams B., Wrigley J y Harrison T.** 3,4-Fused cyclohexyl sulfones as γ -secretase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* (2006) 16: 3073-3077.
- Shimohama S., Taniguchi T., Fujiwara M. y Kameyama M.** Biochemical characterization of alpha-adrenergic receptors in human brain and changes in Alzheimer-type dementia. *J Neurochem* (1986, a) 47: 1295-1301.
- Shimohama S., Taniguchi T., Fujiwara M. y Kameyama M.** Changes in β -adrenergic receptors subtypes in Alzheimer-type dementia. *J Neurochem* (1986, b) 48: 1215-1221.
- Shirotani K., Tsubuki S., Iwata N., Takaki Y., Harigaya W., Maruyama K., Kiryu-Seo S., Kiyama H., Iwata N., Tomita T., Iwatsubo T. y Saido T.C.** Neprilysin degrades both amyloid β peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorfan and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *J Biol Chem* (2001) 276: 21895-21901.
- Simakova O. y Arispe N.J.** Early and late cytotoxic effects of external application of the Alzheimer's A β result from the initial formation and function of A β ion channels. *Biochem* (2006) 45: 5907-5915.
- Siman R. y Salidas S.** Gamma-secretase subunit composition and distribution in the presenilin wild-type and mutant mouse brain. *Neuroscience* (2004) 129: 615-628.
- Simon M.I., Strathmann M.P. y Gautam N.** Diversity of G-proteins in signal transduction. *Science* (1991) 252: 802-808.
- Singh I.N., McCartney D.G. y Kanfer J.N.** Amyloid beta protein (25-35) stimulation of phospholipase A₂, C y D activities of LAN-2 cells. *FEBS Lett* (1998) 365: 125-128.
- Singh V.K.** Studies of neuroimmune markers in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* (1994) 9: 73-81.
- Slama A., Haidet V., Cervera P., Hirsch E., Javoy-Agid F. y Epelbaum J.** Preservation of somatostatin receptors coupled to the inhibition of adenylate cyclase in the cortex and hippocampus in senile dementia of the Alzheimer type. *Dementia* (1991) 2: 88-94.
- Smalley K.S., Feniuk W. y Humphrey P.P.** Differential agonist activity of somatostatin and L-362855 at human recombinant sst4 receptors. *Br J Pharmacol* (1998) 125: 833-841.
- Smilack J.D.** The tetracyclines. *Clin Proc* (1999) 74: 727-729.
- Sparey T., Beher D., Best J., Biba M., Castro J.L., Clarke E., Hannam J., Harrison T., Lewis H., Madin A., Shearman M., Sohal B., Tsou N., Welch C. y Wrigley J.** Cyclic sulfamide γ -secretase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* (2005) 15: 4212-4216.



- Srikant C.B. y Patel Y.C.** Somatostatin receptors: identification and characterization in rat brain membranes. *Proc Natl Acad Sci* (1981) 78: 3930-3934.
- Stepanichev M.Y., Onufriev M.V., Mitrokhina O.S., Moiseeva YuV, Lazareeva N.A. y Victorov I.V.** Neurochemical, behavioural and neuromorphological effects of central administration of β -amyloid peptide (25-35) in rat. *Neurochemistry (Nejrokhimija Rus)* (2000) 17: 291-306.
- Stepanichev M.Y., Zdobnova I.M., Zarubenko I.I., Moiseeva Y.V., Lazareva N.A., Onufriev M.V. y Gulvaeva N.V.** Amyloid- β (25-35)-induced memory impairment correlate with cells loss in rat hippocampus. *Physiol Behav* (2004) 80: 647-655.
- Strittmatter M., Cramer H., Reuner C., Strubel D., Hamann G. y Schimrigk K.** Molecular forms of somatostatin-like immunoreactivity in the cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of the Alzheimer type. *Biol Psychiatry* (1997) 41: 1124-1130.
- Strittmatter W.J., Saunders A.M., Schmechel D., Pericak-Vance M., Enghild J., Salvesen G.S. y Roses A.D.** Apolipoprotein E: high-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90: 1977-1981.
- Strowski M.Z., Parmar R.M., Blake A.D. y Schaeffer J.M.** Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptor subtypes. An *in vitro* of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinol* (2000) 141: 111-117.
- Sun M.K. y Alkon D.L.** Impairment of hippocampal CA1 heterosynaptic transformation and spatial memory by beta-amyloid (25-35). *J Neurophysiol* (2002) 87: 2441-2449.
- Sunahara R.K. y Taussig R.** Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* (2002) 2: 168-184.
- Suo Z., Wu M., Citron B.A., Wong G.T. y Festoff B.W.** Abnormality of G-protein- coupled receptor kinases at prodromal and early stages of Alzheimer's disease: an association with early β -amyloid accumulation. *J of Neurosci* (2004) 24: 3444-3452.
- Takaki Y., Iwata N., Tsubuki S., Taniguchi S., Toyoshima S., Lu B., Gerard N.P., Gerard C., Lee H.J., Shirotani K. y Saido T.C.** Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid β peptide in the brain. *J Biochem (Tokyo)* (2000) 128: 897-902.
- Tallent M., Liapakis G., O'Carroll A.M., Lolait S.J., Dichter M. y Reisine T.** Somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 couple negatively an L-type Ca^{2+} current in the pituitary cell line AtT-20. *Neuroscience* (1996) 71: 1073-7081.
- Thangaraju M., Sharma K., Liu D., Shen S.H. y Strikant C.B.** Interdependent regulation of intracellular acidification and SHP-1 in apoptosis. *Cancer Res* (1999) 59: 1649-1654.
- Tikka T.M. y Koistinaho J.E.** Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* (2001) 166: 7527-7533.
- Tomura H., Okajima F., Akbar M., Majid M.A., Sho K. y Kondo Y.** 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* (1994) 200: 986-992.
- Tong L., Thornton P.L., Balazs R. y Cotman C.W.** Beta-amyloid-(1-42) impairs activity-dependent cAMP-responses element-binding protein signalling in neurons at concentrations in which cell survival is not compromised. *J Biol Chem* (2001) 276: 17301-17306.
- Toro V.C., Tehranian R., Zetterstrom M., Eriksson G., Langel U., Bartfai T. y Iverfeldt K.** Increased gene expression of interleukin-1alpha and interleukin 6 in rat primary glial cells induced by beta-amyloid fragment. *J Mol Neurosci* (2001) 17: 341-350.
- Tran M.H., Yamada K., Olanin A., Mizuno M., Ren X.H. y Nabeshima T.** Amyloid β -peptide induces nitric oxide production in the rat hippocampus: association with cholinergic dysfunction and amelioration by inducible nitric oxide synthase inhibitors. *FASEB J* (2001) 15: 1407-1409.
- Tsine R.W., Bean B.P., Hess P., Lansman B., Nilius B. y Nowycky M.** Mechanisms of calcium channel modulation by beta-adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonist. *J Mol Cell Cardiol* (1986) 18: 691-710.



- Tucker S., Ahl M., Bush A., Westaway D., Huang X. y Rogers J.T. Pilot study of the reducing effect on amyloidosis in vivo by three FDA pre-approved drugs via the Alzheimer's APP5' untranslated region. *Curr Alzheimer Res* (2005) 2: 249-254.
- Tulipano G., Stumm R., Pfeiffer M., Kreienkamp H.J., Höllt V. y Schulz S. Differential β -arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes. *J Biol Chem* (2004) 279: 21374-21382.
- Turner P.R., O'Connor K., Tate W.P. y Abraham W.C. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* (2003) 70: 1-32.
- Van Calker D., Muller M. y Hamprecht B. Regulation by secretin VIP and somatostatin of cyclic AMP accumulation in cultured brain cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1980) 77: 6907-6911.
- Varadarajan S., Kanski J., Aksenova M., Lauderback C. y Butterfield D.A. Different mechanism of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's $A\beta(1-42)$ and $A\beta(25-35)$. *J Am Chem Soc* (2001) 123: 5625-5631.
- Varadarajan S., Yatin S., Aksenova M. y Butterfield D.A. Review: Alzheimer's amyloid- β -peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol* (2000) 130: 184-208.
- Vécsei L., Bollok I. y Telegdy G. Phenoxybenzamine antagonizes somatostatin-induced anti-amnesia in rats. *Eur J Pharmacol* (1984) 99: 325-328.
- Viollet C., Vaillend C., Videau C., Bluet-Pajot M.T., Ungerer A., L'Heritier A., Koop C., Potier B., Billard J., Schaeffer J., Smith R.G., Rohrer S.P., Wilkinson H., Zheng H. y Epelbaum J. Involvement of sst2 somatostatin receptor in locomotor, exploratory activity and emotional reactivity in mice. *Eur J Neurosci* (2000) 12: 3761-3770.
- Vitolo O.V., Sant'Angelo A., Costanzo V., Battaglia F., Arancio O. y Shelanski M. Amyloid β -peptide inhibition of PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99: 13217-13221.
- Waal N.D., Yang W., Oslob J.D., Arkin M.R., Hyde J., Lu W., McDowell R.S., Yu C.H. y Raimundo B.C. Identification of nonpeptidic small-molecule inhibitors of interleukin-2. *Bioorg Med Chem Lett* (2005) 15: 983-987.
- Wallin A., Carlsson A., Ekman R., Gottfries C.G., Karlsson I., Svennerholm L. y Widerlov E. Hypothalamic monoamines and neuropeptides in dementia. *Eur J Neuropsychopharmacol* (1991) 1: 165-158.
- Walter J., Capell A., Hung A.Y., Langen H., Schnolzer M., Tinkaran G., Sisodia S.S., Selkoe D.J., y Haas C. Ectodomain phosphorylation of β -amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J Biol Chem* (1997) 272: 1896-1903.
- Walton M., Woodgate A.M., Muravlev A., Xu R., During M.J. y Dragunow M. CREB phosphorylation promotes nerve cell survival. *J Neurochem* (1999) 73: 1836-1842.
- Wang S.S., Kazantzi V. y Good T.A. A kinetic analysis of the mechanism of beta amyloid induced G protein activation. *J Theor Biol* (2003) 221: 269-278.
- Wang S.S., Rymer D.L. y Good T.A. Reduction in cholesterol and sialic acid content protects cells from toxic effects of beta-amyloid peptides. *J Biol Chem* (2001) 276: 2523-2530.
- Wang X., Zhu S., Drozda M., Zhang W., Stavrovskaya I.G., Cattaneo E., Ferrante R.J., Kristal B.S. y Friedlander R.M. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100: 10483-10487.
- Warpman U., Alafuzoff I. y Norberg A. Coupling of muscarinic receptors to GTP proteins in postmortem human brain alterations in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* (1993) 150: 39-43.
- Weber S.J., Louis R.B., Trombley L., Bisette G., Davies P. y Davies T.P. Metabolic half-life of somatostatin and peptidase activities are altered in Alzheimer's disease. *J Gerontol* (1992) 47: B18-B25.
- Wei W., Norton D.D., Wang X. y Kuriak J.W. $A\beta$ 17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain* (2002) 125: 2036-2043.
- Weidemann A., König G., Bunke D., Fischer P., Salbaum J.M., Masters C.L. y Beyreuther K. Identification, biogenesis and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* (1989) 57: 115-126.



- Weingarten M.D., Lockwood A.H., Hwo S.Y. y Kirschner M.W. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* (1975) 72: 1858-1862.
- Weiss R.E., Reddi A.H. y Nimni M.E. Somatostatin can locally inhibit proliferation and differentiation of cartilage and bone precursor cells. *Calcif Tissue Int* (1981) 33: 425-430.
- Wells K., Farooki A.A., Liss L. y Horrocks L.A. Neural membrane phospholipids in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* (1995) 20: 1329-1333.
- Whitford C., Candy J., Edwardson J. y Perry R. Cortical somatostatinergetic system not affected in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Neurol Sci* (1988) 86: 13-18.
- Wise P.M. Estrogens and neuroprotection. *Trends Endocrinol Metab* (2002) 13: 229-230.
- Woltje M., Kraus J. y Holtt V. Identification of a functional 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element within the second promoter of the mouse somatostatin receptor type 2 gene. *FEBS Lett* (1998) 440: 107-110.
- Wu D.C., Jackson-Lewis V., Vila M., Tieu K., Teismann P., Vadseth C., Choi D.K., Ischiropoulos H. y Przedborski S. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model Parkinson disease. *J Neurosci* (2002) 22: 1763-1771.
- Xia W., Zhang J., Kholodenko D., Citron M., Podlisny M.B., Teplow D.B., Haas C., Seubert P., Koo E.H. y Selkoe D.J. Enhance production and oligomerization of the 42-residue amyloid β -protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins. *J Biol Chem* (1997) 272: 7977-7982.
- Xie L., Helmerhorst E., Taddei K., Plewright B., Van Bronswijk W. y Martins R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci* (2002) 22: RC221.
- Xu Y., Berelowitz M. y Bruno J.F. Dexamethasone regulates somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in rat pituitary GhaC1 cells. *Endocrinol* (1995) 136: 5070-5075.
- Yamada K. y Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol and Therap* (2000) 88: 93-113.
- Yamada Y., Post S.R., Wang K., Tager H.S., Bell G.I. y Seino S. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89: 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. Somatostatin receptors an expanding gene family: cloning and molecular characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase *Mol Endocrinol* (1993) 6: 2136-2142.
- Yamaguchi Y. y Kawashima S. Effects of amyloid- β -(25-35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat. *Eur J Pharmacol* (2001) 412: 265-272.
- Yamamoto M., Gotz M.E., Ozawa H., Luckhaus C., Saito T., Rosler M. y Riederer P. Hippocampal level of neural specific adenylate cyclase type I is decreased in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* (2000) 1535: 60-68.
- Yamazaki T., Selkoe D.J. y Koo E.H. Trafficking of cell surface β -amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons. *J Cell Biol* (1995) 129: 431-442.
- Yan S., Li M., Chai H., Yang H., Lin P.H., Yao Q. y Chen C. TNF- α decrease expression of somatostatin, somatostatin receptors and cortistatin in human coronary endothelial cells. *J Surg Res* (2005) 123: 294-301.
- Yankner B.A., Duffy L.K. y Kirshnet D. A. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* (1990) 250: 279-282.
- Yasojima K., Akiyama H., McGeer E.G., y McGeer P.L. Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of β -amyloid peptide. *Neurosci Lett* (2001) 297: 97-100.
- Yasuda K., Rens-Domiano S., Breder C.D., Law S.F., Saper C.B., Reiseni T. y Bell G. Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylyl cyclase. *J Biol Chem* (1992) 267: 20422-20428.
- Yatani A., Birnbaumer A.M. y Brown A.M. Direct coupling of the somatostatin receptor to potassium channels by a G protein. *Metabolism* (1990) 39: 91-95.



- Yates S.L., Burgers L.M., Kocsis-Angle J., Antal J.M., Dority M.D., Embury P.B., Piotrkowski A.M. y Brunden K.R.** Amyloid beta and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. **J Neurochem** (2000) 74: 1017-1025.
- Yew D.T. y Chan W.Y.** Early appearance of acetylcholinergic, serotonergic, and peptidergic neurons and fibers in the developing human central nervous system. **Microsc Res Tech** (1999) 45: 389-400.
- Yin J.C., Wallach J.S., Del Vecchio M., Wilder E.L., Zhou M., Quinn W.G. y Tully T.** Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. **Cell** (1994) 79: 49-58.
- Yrjänheikki J., Thika T., Keinänen R., Goldsteins G., Chan P.H. y Koistinaho J.** A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with therapeutic window. **Proc Nat Acad Sci USA** (1999) 93: 13496-13500.
- Zee E.A., Benoit R., Strosberg A.D. y Luiten P.G.M.** Coexistence of muscarinic acetylcholine receptors and somatostatin in nonpyramidal neurons of the rat dorsal hippocampus. **Brain Res Bull** (1991) 26: 343-351.
- Zeggari M., Esteve J.P., Raully I., Cambillau C., Mazarguil H., Dufresne M., Pradayrol L., Chayvialle J.A., Vaysse N. y Susini C.** Copurification of a protein tyrosine phosphatase with activated somatostatin receptors from rat pancreatic acinar membranes. **Biochem J** (1994) 303: 441-448.
- Zhang W., Narayanan M. y Friedlander R.M.** Additive neuroprotective effects of minocycline with creatine in a mouse model of ALS. **Ann Neurol** (2003) 53: 267-270.
- Zhu S., Stravrouskaya I.G., Drozda M., Kim B.Y., Ona V., Li M., Sarang S., Liu A.S., Hartley D.M., Wu d.C., Gullans S., Ferrante R.J., Przedborski S., Kristal B.S. y Friedlander R.M.** Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. **Nature** (2002) 417: 74-78.